Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
endokriner und Stoffwechselerkrankungen
Direktor: Professor Dr. Derek Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

In-vitro-Biokonversion von Pregnenolon bei normalen und artifiziell kurzzeitig kryptorchen Ratten während der Reifeperiode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl Bernhard Nübel
aus Reutlingen

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0050

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
endokriner und Stoffwechselerkrankungen
Direktor: Professor Dr. Derek Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

In-vitro-Biokonversion von Pregnenolon bei normalen und artifiziell kurzzeitig kryptorchen Ratten während der Reifeperiode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl Bernhard Nübel
aus Reutlingen

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Lempp
Berichterstatter: Prof. Dr. Derek Gupta

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1
1.1 Testosteronsynthese 1
1.2 Der Hoden 5
1.3 Testosteronmetabolismus und Testes bei Kryptorchismus . . 5

2. FRAGESTELLUNG 7

3. METHODE 8
3.1 Versuchstiere 8
3.2 Materialien 8
3.2.1 Substrat ^{3}H-PREGNENOLON 8
3.2.2 Chemikalien 11
3.2.3 Inkubationsmedium 11
3.2.4 Liquid-Scintillation-Spectrometer 12
3.3 Inkubation 12
3.4 Extraktion 12
3.5 I. Trennungsverfahren : Große Dünnschichtchromatografie . 14
3.6 II. Trennungsverfahren : Azetylierung und Dünnschicht-chromatografie 17
3.7 III. Trennungsverfahren : Papierchromatografie 20

4. ERGEBNISSE 22
4.1 Ergebnisberechnung 22
4.2 Ergebnisse 20 Tage alter Tiere 25
4.3 Ergebnisse 27 Tage alter Tiere 26
4.4 Ergebnisse 39 Tage alter Tiere 26
4.5 Ergebnisse 49 Tage alter Tiere 27
4.6 Ergebnisse 60 Tage alter Tiere 28
4.7 Ergebnisse 69 Tage alter Tiere 29
4.8 Ergebnisse 94 Tage alter Tiere 29
4.9 Relation zwischen Androst-4-en-dion und Testosteron . . 44
4.10 Relation zwischen Androsteron und Testosteron 45
4.11 Relation zwischen Androstandiol und Testosteron . . . 46
4.12 Relation zwischen Σ 5α-reduz. Metaboliten und Testosteron 47
4.13 Gewichtsveränderungen bei kryptorchen Hoden . . . 48

5. DISKUSSION 49

6. ZUSAMMENFASSUNG 53

7. DANKSAGUNGEN 55

8. LITERATURVERZEICHNIS 56

Verzeichnis der Tabellen II

Verzeichnis der Abkürzungen, Trivialnamen und systematischen Bezeichnungen III

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle I : Kryptorche Tiere
Anzahl , Betäubungsmitteldosis, Tiergewichte
Hodengewichte 9

Tabelle II : Normaltiere
Anzahl, Betäubungsmitteldosis, Tiergewichte
Hodengewichte 10

Tabelle III : R_f-Werte der I. Dünnschichtchromatografie
Referenzsteroide 15

Tabelle IV : R_f - Werte der II. Dünnschichtchromatografie
Referenzsteroide nach Azetylierung 18

Tabelle V : cm-Meßwerte der Papierchromatografie 21

Tabelle VI : Ergebnisübersicht Normaltiere 23

Tabelle VII : Ergebnisübersicht kryptorche Tiere 24

Tabelle VIII : Übersicht über die Relationen einzelner Steroide
zu Testosteron : Quotientwerte 48

ABKÜRZUNGEN	TRIVIALNAMEN	SYSTEMATISCHE BEZEICHNUNGEN
Adiol	ANDROSTANDIOL	5α-Androstan-3α-17β-diol
		5α-Androstan-3β-17β-diol
Adion	ANDROSTANDION	5α-Androstan-3,17-dion
Andro	ANDROSTERON	3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on
Δ 5	ANDROSTENDIOL ANDROST-5-EN-DIOL	Androst-5-en-3β,17β-diol
Δ 4	ANDROSTENDION	Androst-4-en-3,17-dion
DHA	DEHYDROEPIANDROSTERON	3β -Hydroxyandrost-5-en-17-on
DHT	DIHYDROTESTOSTERON	17β-Hydroxy-5α -androstan-3-on
17-OH-Preg	17-OH-PREGNENOLON	3β-17α-Dihydroxypregn-5-en-20-on
17-OH-Prog	17-OH-PROGESTERON	17α-Hydroxypregn-4-en-3,20-dion
Preg	PREGNENOLON	3β-Hydroxypregn-5-en-20-on
Prog	PROGESTERON	Pregn-4-en-3,20-dion
Testo	TESTOSTERON	17β-Hydroxy-androst-4-en-3-on
Cholesterin		Cholest-5-en-3β-ol
20α-22β-Dihydroxycholesterin		Cholest-5-en-20α,22β-diol
G-6-P	Glucose - 6 - Phosphat	
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid	
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (Oxydierte Form)	
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (Reduzierte Form)	
POPOP	Dimethyl-POPOP	1,4-bis 2-(4-Methyl-5-Phenoxazoyl)-Benzol
PPO	2,5- Diphenyloxazol	

1. EINLEITUNG

1.1 Die Testosteronsynthese

In der Synthese der Androgene ist der Hoden das bedeutendste und wichtigste Gewebe . Eine zentrale Rolle spielt dabei der Metabolismus des Testosterons, der schon Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war.

Vorläufer der Androgene ist das Cholesterin - überwiegend endogenen Ursprungs (Morris und Chaikow, 40) - , das nach Seitenkettenverkürzung und der Abspaltung von Isocapronsäure zur ersten Schlüsselsubstanz , dem Pregnenolon, führt.

Vom Pregnenolon aus führen zwei auch untereinander verknüpfte Synthesewege zum Testosteron :

- der nach der Position der Doppelbindung im Steroidgerüst so bezeichnete Δ-5-Weg
- und der Δ-4-Weg .

Der 1956 von Slaunwhite und Samuels (54) nach In-vitro-Untersuchungen an Rattenhoden erstmals beschriebene und später auch von anderen Autoren (Lynn und Brown,39 ; Tamaoki und Shikita,57 ; u.a.) bestätigte Δ-4-Weg beginnt damit, daß durch eine gekoppelte Isomerase-3β-OH-Steroid-Dehydrogenase-Reaktion aus Pregnenolon Progesteron entsteht . Nach 17α-Hydroxylierung von Progesteron entsteht über 17-OH-Progesteron und anschließender Seitenkettenspaltung durch die C17,20-Lyase Androstendion. Dieses auch als Proandrogen bezeichnete Steroid steht über die 17β-OH-Steroid-Dehydrogenase mit Testosteron in Wechselbeziehung ; über Androstendion läuft auch ein kataboler Schritt im Testosteronmetabolismus.

Erste Untersuchungen über den Δ-5-Weg erschienen 1960 von Neher und Wettstein(42) an Hoden und Nebennierenrindengewebe bei Rindern, die Kahnt(37) 1961 bestätigte . Hagen und Eik-Nes (28) fanden diesen Syntheseweg in vivo bei Hunden ; Yanaihara und Troen (60) sowie Ruokonen und Vikho (49) beschrieben ihn für Humangewebe. Im Δ-5-Weg wird Pregnenolon durch die 17α-Hydroxylase in 17-OH-Pregnenolon umgewandelt, das nach der Seitenkettenspaltung durch die C17,20-Lyase zu Dehydroepiandrosteron wird. Die 17β-OH-Steroid-Dehydrogenase führt zum Androstendiol, das durch eine gekoppelte Isomerase-3β-OH-Steroid-Dehydrogenase-

Reaktion zu Testosteron umgewandelt wird. Eik-Nes und Kekre(12) stellten wie andere Autoren Querverbindungen zwischen beiden Syntheseswegen fest. Welcher Syntheseweg dominiert , ist nicht eindeutig zu sagen. Für beide Wege liegen In-vitro- wie In-vivo-Untersuchungen vor, die auch von Spezies zu Spezies Unterschiede aufweisen; für In-vitro-Untersuchungen an Ratten zeigt der Δ-4-Weg Präferenz.(51,57, 58,39).

Auch der Katabolismus des Testosterons findet im Hodengewebe statt. Dabei wird Testosteron über 2 Wege, die untereinander ebenfalls Querverbindungen aufweisen (Baulieu und Mauvais-Jarvis,2; Steinberger und Ficher,56; Yamada u.a.,59), abgebaut.
Kennzeichen des 17-OH-Weges ist die OH-Gruppe an Position 17; dieser Weg führt vom Testosteron nach 5α-Reduktion zum DHT und zu 5α-Androstandiol.
Kennzeichen des 17-Keto-Weges ist die Keto-Gruppe an Position 17 des Sterangerüstes; dieser Weg führt über Androstendion nach Reduktion zu 5α-Androstandion zu Androsteron.
Erst durch die 5α-Reduktion wird Testosteron in metabolisch im Zielgewebe wirksame Steroide umgewandelt.

Abbildung 1 und 2 auf den beiden folgenden Seiten geben einen Überblick über den Testosteronmetabolismus.

Erläuterung zu Abb.1 und 2:

Enzyme :
1 Cholesterin-20α-Hydroxylase
2 Cholesterin-22β-Hydroxylase
3 Cholesterin-C20,22-Lyase
4 Δ5-Δ4-Steroid-Isomerase
5 3β-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase
6 17α-Hydroxylase
7 C17,20-Lyase (Desmolase)
8 17β-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase
9 Steroid-5α-Reduktase
10 3α-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase

Cofaktoren:
a $NADPH + H^+ , O_2$
b $NAD(P)^+$
c $NAD(P)H + H^+$
d Akzeptor · H_2

Abb.1

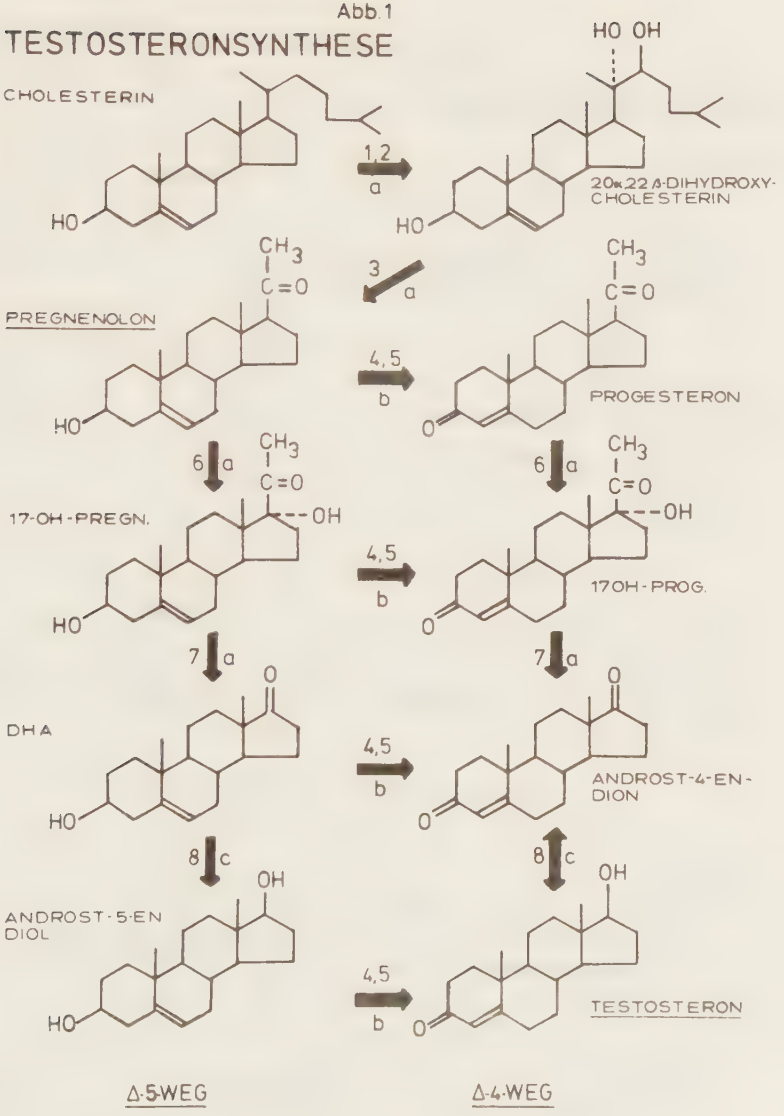


Abbildung 1: Grafische Darstellung der Synthesewege des Testosterons, ausgehend vom Cholesterin . (Erläuterung der Zahlen und Buchstaben auf Seite 2) .

Abb.2

TESTOSTERONABBAU

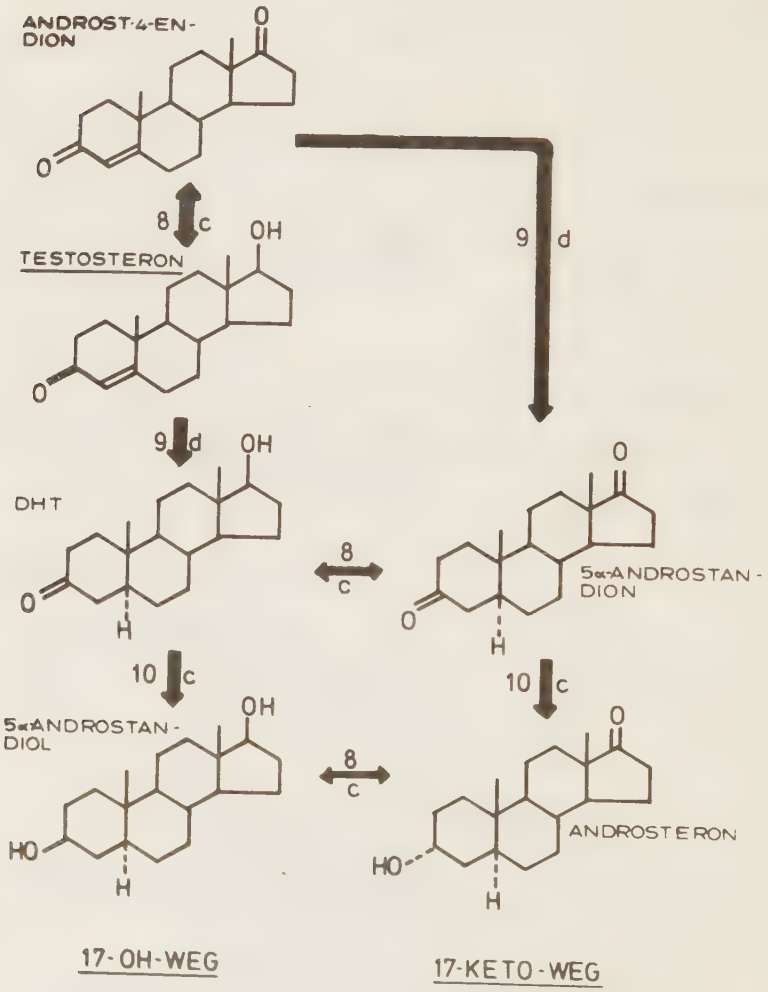


Abbildung 2: Grafische Darstellung der Abbauwege des Testosterons.
(Erläuterung auf Seite 2)

1.2. Der Hoden

Das Hodengewebe gliedert sich in zwei Zellpopulationen, die Tubuli seminiferi mit einem Anteil von 90 % und die Leydig'schen Zwischenzellen oder das interstitielle Gewebe mit einem Anteil von 6 % am Gesamtgewebe (Christensen und Mason,5) . Beide Gewebe üben endokrine Funktionen aus, wobei die Testosteronsynthese, insbesondere die Synthese der Schlüsselsubstanzen aus Cholesterol in den interstitiellen Zellen stattfindet . Der Katabolismus des Testosterons findet dagegen in den Tubuli seminiferi statt (Christensen und Mason,5; Hall,30) .

Die am Metabolismus des Testosterons beteiligten Enzyme wurden von verschiedenen Forschergruppen nachgewiesen (Lynn und Brown,39; Murota u.a.41; Shikita und Tamaoki,52) . Alle Enzyme für die Umwandlung in Testosteron sowie für dessen Abbau sind in den Mikrosomen lokalisiert. Als Cofaktoren fungiert primär NADPH (und NAD) neben molekularem O_2. Von japanischen Forschern (51,52) wird nach Ultrazentrifugation von Zellbestandteilen mit 105,000 x g im Überstand ein Faktor beschrieben, der stimulierend auf die Testosteronsynthese einwirkt.
Die Androgensynthese selbst unterliegt der Steuerung durch die Gonadotropine und deren Releasing Factors im Hypothalamus-Hypophysen-Testes-Feedback-Mechanismus, wie Gupta(18) und Gupta und Rager(22,23) berichten.

1.3. Testosteronmetabolismus und Testes bei Kryptorchismus

Beim Kryptorchismus kommt es infolge der durch die entrope Lage der Hoden bedingten erhöhten Gewebetemperatur zu den verschiedensten morphologischen und biochemischen Veränderungen . Clegg(6,7,8) berichtete über bereits nach fünftägigem Kryptorchismus auftretende Disorganisationen des Keimepithels. Neben einer Gewichtsabnahme abdomineller Hoden wird über eine nach 4 Tagen experimentellen Kryptorchismus auftretende grundsätzliche Aktivitätserhöhung tubulärer Elemente berichtet, über die Hyalinisierung der Spermatozyten 1.Ordnung und Lösung der Spermatiden vom Keimepithel in das Lumen (Kormano u.a.,38; Davis und Firlitt,9). Neben einer Verminderung der 3β-OH-Steroid-Dehydrogenase (51) werden weitere Veränderungen der Enzymaktivität im Testosteronmetabolismus beschrieben (Inano und Tamaoki,35).

Gupta u.a. berichten von Veränderungen der Gonadotropine in der Hypophyse (Gupta u.a.,24,25; Rager u.a.46, Eichner u.a.,10) .Auch bei Kryptorchismus wurden veränderte Androgenwerte im Serum beobachtet (Gupta und Mc Gafferty,20 ; Gupta und Zarzycki,27; Rager,27; Eichner u.a.,11).
Untersuchungen über Teilschritte der Androgensynthese bei Hodenhochstand liegen ebenfalls vor (Gupta und Rager,21; Rager und Arnold,45).

Die Forschung der Tübinger Endokrinologen (Gupta,Rager u.a.) stehen in engem Zusammenhang mit der Problematik des Maldescensus testis und des Kryptorchismus bei Kindern (26,21,19,4,36,44).
Auch die vorliegende Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten .

2. FRAGESTELLUNG

Schlüsselsubstanz der Androgenbiosynthese stellt das PREGNENOLON dar.

Zwei verschiedene Synthesewege, über deren Dominanz noch immer widersprüchliche Untersuchungen vorliegen, führen zum TESTOSTERON.
Ziel dieser Arbeit ist es, einen Oberblick über das Gesamtspektrum der am Testosteronmetabolismus beteiligten Steroide nach zweistündiger Inkubation von Rattenhoden aus verschiedenen Altersstufen während der sexuellen Reifeperiode mit ^{3}H-PREGNENOLON zu erstellen. Dabei soll untersucht werden, welches die aus PREGNENOLON im Testosteronmetabolismus vorwiegend synthetisierten Steroide sind und welche Veränderungen in ihrer Wertigkeit im Laufe der Reifeperiode der Ratten eintreten.

Über die biochemischen Veränderungen, die durch die abdominale Lage kryptorcher Hoden das Synthesemuster und den Katabolismus des Testosterons beeinflussen, liegen nur spärliche Veröffentlichungen vor. Die Paralleluntersuchung von kurzzeitig kryptorchen Rattenhoden verschiedener Altersstufen während der sexuellen Reifeperiode soll Aufschluß über die Art und das Ausmaß von Abweichungen im Testosteronmetabolismus erbringen.

3. METHODE

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten aus der Zucht Ivanovac, Kisslegg/Allgäu. Zur Erzeugung eines experimentellen Kryptorchismus wurde jeweils eine Gruppe von 16, 23, 45, 56, 65 und 90 Tage alten Tieren durch intraperitoneale Injektion mit NEMBUTAL^{R} (Deutsche Abott) anästhesiert, die Hoden aus dem Hodensack in die Bauchhöhle verlagert und der Processus vaginalis anschliessend durch 4 bis 6 U-Nähte verschlossen.

Am 4. Tag postoperativ wurden die Tiere nach kurzer Chloroformnarkose dekapitiert, die Hoden entnommen und bis zur Weiterverarbeitung kurzfristig auf Trockeneis eingefroren.
Parallel dazu wurden einer entsprechend gleichaltrigen Gruppe von Normaltieren auf dieselbe Arte die Hoden entnommen.

Tabelle I und II geben eine Übersicht über die Anzahl der Tiere, ihr Gewicht , das Hodengewicht und die Betäubungsmitteldosis. (Seite 9/10).

3.2 Materialien

3.2.1 Substrat

[7(n)-^{3}H]Δ5-Pregnenolon mit einer spezifischen Aktivität von 10 Ci/mmol wurde vom Radiochemical Centre, Amersham, Great Britain, bezogen. Der Radiochemische Reinheitsgrad bei Papierchromatografie in Bush A betrug nach Herstellerangabe 98 %.

Dieses radioaktiv markierte Steroid wurde in 20 ml Äthanol p.a. gelöst. 20 µl dieser Lösung ergaben bei der Messung im Liquid Scintillation Counter (PACKARD 3003) ca. 800 000 cpm.

3.2.2 Referenzsteroide

Als nicht markierte Referenzsteroide - im Rahmen anderer Untersuchungen im Hause auf Reinheit hin bereits überprüft - wurden verwendet :

Androsteron (L.Light & Co. Ltd., Colnbrook , England)
Progesteron (L.Light & Co. Ltd., Colnbrook , England)
17-OH-Pregnenolon (Ikapharm , Israel)
Dehydroepiandrosteron (British Drug Houses Ltd, Pook, England)

Tabelle I: Kryptorche Tiere

Alter (Tage)	Anzahl (Stück)	Dosis NEMBUTAL® (mg)	Gewichte willkürlich ausgewählter Tiere (g)	Gewichte willkürlich ausgewählter Hoden re (mg)	li	Ø Gewicht Tiere (g)	Ø Gewicht Hoden (mg)
20	22	1,1	37 31 25 47	126 107 99 111	72 107 104 106	35	105
27	22	1,5	44 46 46 50	186 149 118 151	143 130 207 256	48,5	180
39	11	4,0	81 90 94 85	265 280 394 346	419 276 532 522	87,5	361
49	10	6,0	130 137 141 130	945 689 786 859	927 885 902 959	134,5	872
60	5	8,0	171 172 169 177	926 935 1172 1163	1078 1123 1150 919	172,3	1082
69	8	10	230 213 211 211	1045 1285 1321 1244	1165 1149 1275 1415	216,2	1230
94	10	25	284 274 276 265	1321 1500 1137 1465	1259 1448 1454 1247	274,8	1236

bei einzelnen
Tieren musste mit etwa
10 % der Ausgangsdosis
nachgespritzt werden.

Tabelle II: Normaltiere

Alter (Tage)	Anzahl (Stück)	Dosis NEMBUTAL® (mg)	Gewichte willkürlich ausgewählter Tiere (g)	Gewichte willkürlich ausgewählter Hoden re (mg)	li	Ø Gewicht Tiere (g)	Ø Gewicht Hoden (mg)
20	20	1,1	38	112	94	34,3	122
			31	174	137		
			31	127	138		
			37	100	65		
27	18	1,5	40	79	168	45,0	173
			48	136	142		
			46	233	164		
			46	169	209		
39	10	4	86	538	548	89,0	404
			84	505	476		
			91	524	496		
			95	400	248		
49	6	6,0	133	824	895	135,0	882
			141	884	779		
			129	832	860		
			137	885	879		
60	5	8	176	1242	1150	174,3	1179
			174	851	1339		
			167	1147	973		
			180	1363	1270		
69	5	10	187	1387	1257	183,2	1223
			187	1221	1303		
			189	1235	1100		
			170	1145	1353		
94	5	25	289	1233	1286	287,5	1337
			282	1439	1162		
			288	1432	1340		
			291	1500	1240		

bei einzelnen Tieren musste mit etwa 10 % der Ausgangsdosis nachgespritzt werden.

5α-Androstandiol
Androst-5-en-diol
17α-Hydroxyprogesteron
5α-Dihydrotestosteron
Pregnenolon
Androst-4-en-dion
5α-Androstandion sämtliche von MERCK , Darmstadt

3.2.2 Chemikalien

Sämtliche verwendeten Lösungs- und Laufmittel waren analysenrein (p.a.) (MERCK, Darmstadt)
Die Hank'sche Lösung wurde von der Universitätsapotheke Tübingen hergestellt und sterilisiert.
Die Cofaktoren Glucose-6-Phosphat (MG 304) und NADP (MG 787,4) wurden von BOEHRINGER Mannheim bezogen.

3.2.3 Inkubationsmedium

Das Inkubationsmedium orientiert sich an der von Steinberger und Ficher (55,56) verwendeten Versuchsanordnung. Es wurde an einigen Punkten modifiziert und setzt sich zusammen aus :

20 ml Hank'sche Lösung (NaCl 8,0 g
KCl 0,4 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 0,10 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ 0,14 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,10 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ 0,06 g
KH_2PO_4 0,06 g
Glucose 1,00 g
$NaHCO_3$ 0,35 g H_2O ad 1000 ml)

3,5 ml Glucose-6-Phosphat , Di-Na-Salz ($C_6H_{11}O_9PNa_2$)
MG 304 , 36,17 µmol/ml

3,5 ml NADP Di-Na-Salz ($C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_2$)
MG 787,4 , 3,257 µmol/ml

2,5 ml $NaHCO_3$, 1,3% in aqua dest.

Mit 0,1n HCl wurde auf ein physiologisches pH von 7,40 eingestellt.
1,5 ml Inkubationslösung wurden 1 g Hodenmaterial zugesetzt.

3.2.4 Liquid-Scintillation-Spectrometer

Die radioaktiven Messungen wurden mit einem Liquid-Scintillation-Spectrometer , Modell 3003, PACKARD Instruments, durchgeführt.

Die Scintillationsflüssigkeit setzte sich zusammen aus
PPO 2,5 Diphenyloxazol (12,5 g)
POPOP 2,2p-Dimethylpopop (250 mg)
Toluol (2,5 l)
Ein Meßansatz wurde in 10 ml Scintillationsflüssigkeit gelöst.

3.3 Inkubation

Den Versuchstieren wurden nach kurzer Chloroformnarkose und anschließender Dekapitation beide Hoden entnommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Trockeneis tiefgefroren.

Anschließend wurden die gefrorenen Hoden gewogen, durch Querschnitte gedrittelt und jeweils aus dem Mittelstück feinste Scheibchen geschnitten.Sämtliche Hodenmittelstücke einer Untersuchungsgruppe wurde gepoolt, nochmals mit dem Skalpell mechanisch zerhackt und schließlich 1 g davon in ein Inkubationsröhrchen eingewogen.

Dazu wurden 1,5 ml Inkubationsmedium und 100 µl ^{3}H-Pregnenolon in äthanolischer Lösung (= 4 Millionen cpm) gegeben und für zwei Stunden im Dubnoff-Shaker unter Carbogeneinleitung und im Wasserbad von 37^{o} C inkubiert.
Nach zwei Stunden wurde die Inkubation abgebrochen, das Hodenmaterial mit einem Braun-Melsungen-Homogenisator aufbereitet und mit 10 ml Essigsäureäthylester kurz und heftig geschüttelt.

3.4 Extraktion

Sodann wurden je 200 µl folgender nicht radioaktiver Referenzsteroide (1 mg/1 ml Äthanol) zugegeben:

- Pregnenolon
- 17-OH-Pregnenolon
- DHA
- Androst-5-endiol

Progesteron
17-OH-Progesteron
Androst-4-endion
Testosteron
DHT
Androstandiol
Androstandion
Androsteron

und wiederum 10 min bei 175 U/min geschüttelt.
Nach Zentrifugation von 5 min Dauer wurde der Überstand quantitativ in frische Glasröhrchen überführt; der Rückstand wurde mit 5 ml warmem Essigsäureäthylester nochmals 10 min bei 175 U/min im Schüttler ausgewaschen und ebenfalls 5 min zentrifugiert.
Beide Überstände wurden vereinigt und im Wasserbad verdampft; die Rückstände wurden verworfen.

Der eingedampfte Überstand wurde nun in 10 ml 70 %igem Methanol gelöst. Dazu wurden 10 ml n-Hexan gegeben und 10 min bei 200 U/min geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die obere Hexanphase abgesaugt und verworfen.
Zur Fettisolation durch Ausfrieren wurde nun der Rückstand zusammen mit einem frischen Glasröhrchen, einem kleinen Trichter samt Filter, 2 Eppendorf-Pipettenspitzen und einem Vorrat an Spülflüssigkeit (Essigsäureäthylester : Methanol = 2:1) über Nacht in einen Gefrierschrank mit - 18°C gegeben. Am nächsten Morgen wurde im Gefrierschrank in das frische Röhrchen filtriert, das alte Röhrchen mit 1 ml gekühlter Spülflüssigkeit ausgewaschen. Nach erfolgter Filtration wurde das Filter ebenfalls mit 2 ml Spülflüssigkeit ausgewaschen.

Im Wasserbad wurde das Filtrat anschliessend verdampft, in 10 ml Chloroform gelöst, zur Neutralisation einmal mit 0,5 ml 1n NaOH, dann zweimal mit je 0,5 ml Aqua dest. versetzt, jeweils geschüttelt, zentrifugiert und die wässrige Phase abgesaugt und verworfen.
Die verbliebene Lösung wurde nach Überführen in ein Spitzglas und Nachspülen mit 1 ml Chloroform wiederum eingedampft.
Dieser nun chromatografiefähige Extrakt wurde erst unmittelbar vor dem Auftragen auf Dünnschichtplatten wieder in 100 µl Essigsäureäthylester gelöst.

3.5 I.Trennungsverfahren

Grosse Dünnschichtchromatografie

Zur chromatografischen Trennung des Hormonextraktes wurden 40 cm x 20 cm (Länge x Breite) grosse Glasplatten verwendet, die auf einer Shandon-Schiene mit einer Kieselgelaufschwemmung (Kieselgel G Typ 60 nach Stahl 75 g gelöst in 150 ml Aqua dest.) von o,5 mm Höhe beschichtet worden waren. Nach kurzer Lufttrocknung wurden die frisch gegossenen Platten für ca. 4 Stunden im Trockenschrank bei 80° C gelagert und dann bis zur Verwendung am nächsten Tag staubfrei und trocken auf Blaugel aufbewahrt.

Für die Auftrennung der radioaktiven Extrakte wurden in die Kieselgelplatten 3 cm breite und 40 cm lange Bahnen bei jeweils 1 cm Zwischenraum geritzt.
Für die Referenzsteroide, die sogenannten "Standards", deren Wanderungspositionen später zur Identifizierung der radioaktiven Auftrennung dienten, waren Platten mit Bahnbreiten von 1,5 cm bei 0,5 cm Zwischenraum vorgesehen.
Mit einer geeichten Pipette wurden jeweils 10 µl der Referenzsteroide (in Äthanol gelöst 1 mg/1 ml) bandenförmig auf der Startlinie 2,5 cm vom Plattenbeginn entfernt aufgetragen.
Die radioaktiven Extrakte wurden unmittelbar vor dem Auftragen in 100 µl Essigsäureäthylester gelöst und dann mit einer Pasteurpipette aufgetragen, ebenfalls bandenförmig auf der 2,5 cm vom Plattenbeginn entfernten Startlinie. Die Extraktgläsßchen wurden 2 mal mit je 100 µl Essigsäureäthylester nachgespült und der Inhalt vollständig aufgetragen.

Die Platten wurden dann im Chromatografieraum (Raumtemperatur 27° C) für eine halbe Stunde akklimatisiert.
Ein 60 cm x 60 cm x 20 cm (Länge x Höhe x Breite) großer Tank war bereits am Vortag mit dem Laufmedium

Diäthyläther : Chloroform = 1 : 9

frisch präpariert worden. Der Tank war allseits mit Fließpapier ausgekleidet. Die Platten wurden nun für 4 Stunden, etwa 1 cm tief im Laufmedium nahezu senkrecht stehend mit nach innen gewandten beschichteten Flächen chromatografiert.

Nach Markierung der Fließmittelgrenzen wurden die Platten entnommmen und in waagrechter Lage getrocknet. Die Platten mit den Referenzsteroiden wurden nun zur Sichtbarmachung der Wanderungspositionen der einzelnen

Standards mit 10 %iger Phosphormolybdänsäurelösung in Isopropanol besprüht und im Trockenschrank bei 100^{o} C 15 min entwickelt. Die einzelnen Steroide waren nun als dunkel gefärbte Bande zu erkennen.
Einen Überblick über die R_f-Werte der Standards gibt Tabelle III.

Tabelle III: Überblick über die R_f-Werte der Referenzsteroide (Standards)
Die aufgetretenen Abweichungen dürften durch die nicht genaue Normierbarkeit der selbstgegossenen Platten sowie durch die infolge Fremdbenutzung nicht ausgeschlossenen Temperaturänderungen im Chromatografieraum begründet sein.

Steroid	Einzelwerte	N	$\bar{x}$	vK	Position
Pregnenolon	0.241 0.293 0.412 0.325	4	0.342	14,67	9
17-OH-Pregnenolon	0.147 0.144 0.145 0.144	4	0.145	0,97	3
DHA	0.241 0.293 0.412 0.281	4	0.275	5,52	8
Androst-5-endiol	0.216 0.139 0.129 0.136	4	0.155	26,37	2
Progesteron	0.543 0.468 0.577 0.522	4	0.528	8,66	11
17-OH-Progesteron	0.218 0.205 0.200 0.208	4	0.208	3,65	4
Androst-4-endion	0.434 0.397 0.495 0.445	4	0.443	9,13	10
Testosteron	0.243 0.207 0.200 0.202	4	0.213	9,49	5
DHT	0.284 0.280 0.305 0.360	4	0.307	11,99	7
Androstandiol	0.240 0.139 0.135 0.136	4	0.163	32,81	1
Androstandion	0.610 0.501 0.617 0.588	4	0.579	9,23	12
Androsteron	0.351 0.279 0.263 0.285	4	0.295	13,17	6

vk = Variationskoeffizient

Die Platten mit der radioaktiven Auftrennung des Hormonextraktes wurden nun unter einem Dünnschicht Scanner(Typ II , LB 2723, BERTHOLD Wiesbaden) mit einer Geschwindigkeit von 300 mm/h abgefahren und die jeweils vorhandene Radioaktivität durch einen angeschlossenen Zweikanalschreiber (Dual Ratemeter Integrator LB 242 K, BERTHOLD, Wildbad) aufgezeichnet. Dabei ergab sich ein Prototyp einer Auftrennungsaufzeichnung, deren einzelne Peaks - Radioaktivitätsdichte markierend - anhand der Standard-Steroide wie folgt identifiziert wurden:

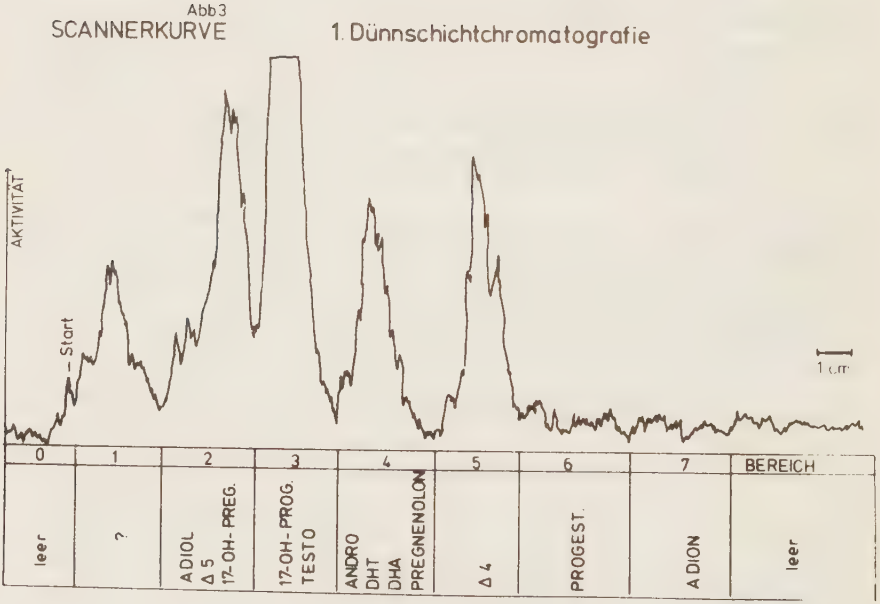


Abbildung 3: 1.Dünnschichtchromatografie. Darstellung der Aufzeichnung des Zweikanalschreibers . Die Peaks ergeben Aufschluss über die Radioaktivitätsdichte im jeweiligen Plattenbereich.Referenzsteroide erlauben die Zuordnung der Peaks zu Steroidgruppen, die in Bereiche unterteilt worden sind.

Die Bereiche 2, 3 und 4 enthielten mehrere Hormone, die in anschließenden Verfahren noch zu trennen waren.

Alle Bereiche wurden nun nach der Scanneraufzeichnung scharf voneinander getrennt und einzeln von der Platte abgekratzt, in Filterglasröhrchen gegeben und durch 3 ml und 2 ml Essigsäureäthylester aus der Kieselgelschicht eluiert. Anschliessend wurde der Essigsäureäthylester verdampft, und das Eluat erneut in 500 µl Äthanol gelöst.
50 µl davon wurden in 10 ml Scintillationsflüssigkeit im Liquid-Scintillation-Spectrometer gezählt, die restlichen 450 µl der Bereiche 2,3 und 4 anderen Trennungsverfahren zugeführt.

3.6. II. Trennungsverfahren
Trennung der Bereiche 2 und 3 durch Azetatbildung und Dünnschichtchromatografie

Die Bereiche 2 (Androstandiol,Androst-5-en-diol und 17-OH-Pregnenolon) und 3 (17-OH-Progesteron, Testosteron), in 450 µl Äthanol gelöst, wurden eingedampft und mit je 100 µl Pyridin und Essigsäureanhydrid versetzt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur verschlossen aufbewahrt und anschließend wiederum im Wasserbad eingedampft. Als Standards wurden je 20 µl der betreffenden Referenzsteroide nach Eindampfen der äthanolischen Lösung ebenso azetyliert.
Die chromatografische Aufbereitung erfolgte auf 20 cm x 20 cm grossen Kieselgelplatten (Herstellung und Daten wie Seite 14). Bahnbreite 1,5 cm bei 0,5 cm Zwischenraum, Startlinie 1,5 cm vom Plattenbeginn entfernt. Unmittelbar vor dem Auftragen wurden die radioaktiven Proben sowie die azetylierten Referenzsteroide in 100 µl Essigsäureäthylester:Methanol = 2:1 gelöst und mit Pasteurpipetten aufgebracht. Die Gläschen wurden ebenfalls zweimal mit je 100 µl des Essigsäureäthylester/Methanol-Gemisches nachgespült.
Anschließend wurden die Platten in einem am Vortag frisch präparierten und an den Frontseiten mit Fließpapier ausgekleideten Tank (22 cm x 22 cm x 10 cm / Länge x Höhe x Breite) bei 27° Raumtemperatur chromatografiert. Laufmittel war ein Gemisch von Benzol : Essigsäureäthylester = 4 : 1 , in das die Platten senkrecht stehend 0,5 cm eingetaucht waren. Die Chromatografiedauer betrug 50 min.

Die Referenzsteroide wurden durch Besprühen mit 10 %iger Phosphormolybdänsäurelösung in Isopropanol angefärbt, sie waren nach kurzer Entwicklung im Trockenschrank als dunkle Bande identifizierbar. Eine Übersicht über die R_f-Werte der azetylierten Referenzsteroide gibt Tabelle IV.

Tabelle IV: Überblick über die R_f-Werte der azetylierten Referenzsteroide.

Steroid	Einzelwerte							N=7 $\bar{x}$	vk
Androstandiol	0.644	0.632	0.616	0.583	0.627	0.660	0.616	0.625	3,89
Androst-5-en-diol	0.634	0.621	0.594	0.562	0.600	0.650	0.594	0.608	4,84
17-OH-Pregnenolon	0.359	0.383	0.308	0.340	0.362	0.430	0.308	0.360	12,63
17-OH-Progesteron	0.146	0.156	0.108	0.140	0.135	0.220	0.108	0.145	26,17
Testosteron	0.414	0.340	0.303	0.367	0.372	0.390	0.308	0.357	11,29

vk = Variationskoeffizient

Da sowohl Referenzsteroide und entsprechende Analyse zur gleichen Zeit im gleichen Tank chromatografiert wurden, wirken sich die Abweichungen nicht auf die Ergebnisse aus.

Die Platten mit den radioaktiven Bereichen 2 und 3 wurden nun unter dem Dünnschichtscanner abgefahren, die Peaks der Aufzeichnung der Radioaktivitätsdichte mittels Zweikanalschreiber wurden anhand der R_f-Werte der Referenzsteroide wie folgt identifiziert :

Bereich 2 siehe Abbildung 4, S.19
Bereich 3 siehe Abbildung 5, S.19

Abb 4

SCANNERKURVE

2. TLC BEREICH 2

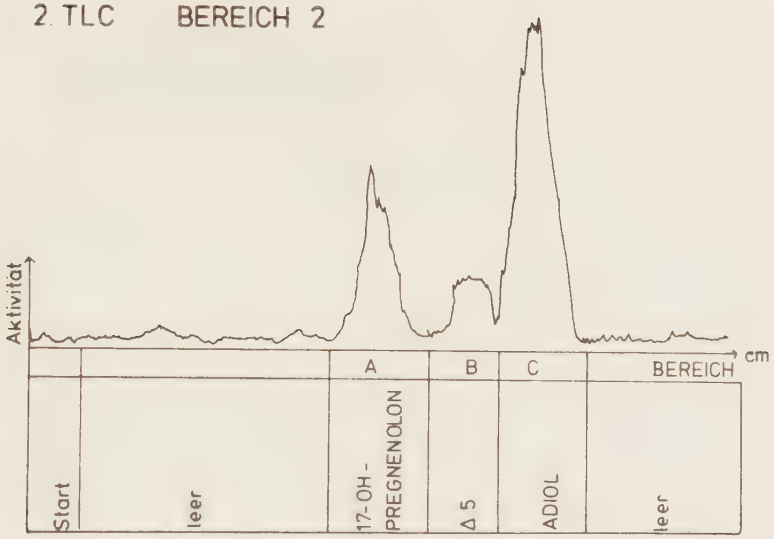


Abb. 4: 2. Dünnschichtchromatografie nach Azetylierung. Bereich 2. Aufzeichnung des Zweikanalschreibers über die Radioaktivitätsdichte auf der Chromatografieplatte. Identifizierung der Steroide nach R_f-Wert.

Abb 5

SCANNERKURVE

2. TLC BEREICH 3

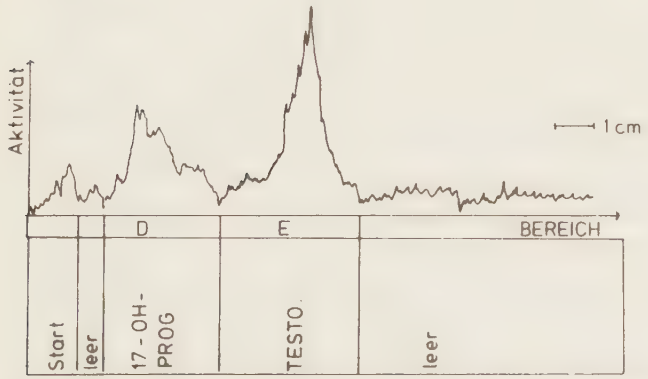


Abb. 5: 2.Dünnschichtchromatografie nach Azetylierung. Bereich 3. Aufzeichnung des Zweikanalschreibers über die Radioaktivitätsdichte auf der Chromatografieplatte. Identifizierung der Steroide nach R_f-Wert.

Die einzelnen Peaks wurden nun als Unterbereiche anhand der Aufzeichnung des Zweikanalschreibers sorgfältig von der Platte isoliert, in Filterglasröhrchen durch 3 ml und 2 ml Essigsäureäthylester aus dem Kieselgel eluiert. Nach Verdampfen des Essigsäureäthylesters und erneutem Lösen der einzelnen Unterbereiche in 500 µl Äthanol wurden je 50 µl im Liquid-Scintillation-Spectrometer gezählt.

3.7. III. Trennungsverfahren
Papierchromatografische Trennung des Bereiches 4

Zur Trennung des Bereiches 4 -Androsteron, DHT, DHA und Pregnenolon- wurde dieser eingedampft, in 100 µl Essigsäureäthylester gelöst und bei zweimaligem Nachspülen auf Papierbahnen (Chromatografiepapier WHATMAN M 2) von 1,5 cm Breite und 56,5 cm Länge auf eine Startlinie 11 cm vom Papierbeginn entfernt bandenförmig aufgetragen.
Jeweils 3 zusammenhängende Streifen mit einem Einzelbahnabstand von 0,5 cm ab Startlinie bildeten eine Einheit; drei Einheiten wurden gleichzeitig in den Shandon-Tank für absteigende Papierchromatografie eingebracht.
Das Fließmittel bestand aus
Petroleumbenzin : Methanol : H_2O = 5 : 4 : 1.
Die radioaktiven Proben wurden 9 Stunden im klimatisierten Chromatografieraum (27° C) chromatografiert, anschließend luftgetrocknet und mit einem Paper-Scanner (BERTHOLD LB 280) abgetastet. Ein Zweikanalschreiber zeichnete die Radioaktivitätsdichte auf.
Die Peaks der Aufzeichnung wurden nun anhand der cm-Meßwerte der Referenzsteroide, die wie oben ausgeführt chromatografiert und mit Phosphormolybdänsäure angefärbt wurden, identifiziert. R_f-Werte waren wegen der durchgelaufenen Fließmittelfront nicht ermittelbar . Meßwert war das Zentrum des Streubereichs des einzelnen Steroids. Tabelle V gibt einen Überblick über die Werte (Seite 21).

Nach der Identifikation wurden die Unterbereiche voneinander getrennt, und über Nacht in Äthanol aus dem Papier eluiert. Nach entsprechender Aufbereitung wurden die Einzelbereiche im Liquid-Scintillation-Spectrometer gezählt.
Abbildung 6 (Seite 21) zeigt die Aufzeichnung des Zweikanalschreibers und die Identifizierung der Unterbereiche.

Abb6

SCANNERAUFZEICHNUNG
PAPIERCHROMATOGRAFIE

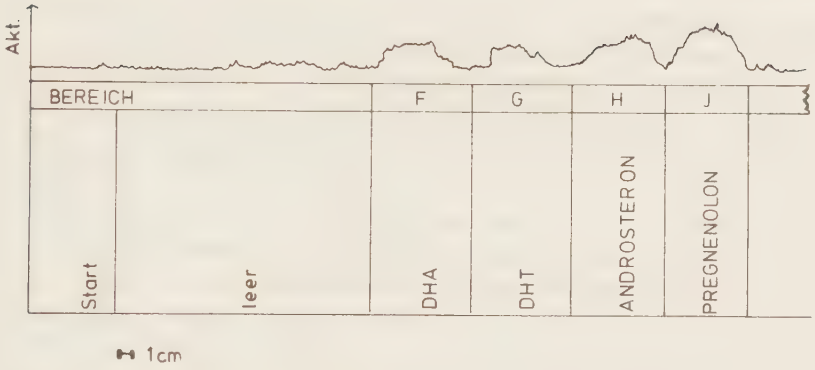


Abbildung 6: Papierchromatografische Trennung des Bereiches 4 der 1. Dünnschichtchromatografie. Aufzeichnung des Zweikanalschreibers über die Radioaktivitätsdichte des Chromatografiepapierstreifens. Identifizierung der Unterbereiche nach cm-Meßwert der Referenzsteroide.

Tabelle V : cm-Meßwerte der Fließstrecke der Referenzsteroide bei Papierchromatografie

Steroid	Einzelwerte	N	$\bar{x}$
DHA	20,6 17,0 17 17,5 17,7 17,7 18,4 19,5	8	18,1
DHT	20,5 22,0 23 23,0 23,0 23,0 24,0 24,5	8	22,9
Androsteron	29,2 29,0 30 30,3 29,0 28,5 29,0 26,5	8	29,5
Pregnenolon	28,2 32,2 32 33,0 32,8 32,8 33,2 33,5	8	32,2

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisberechnung

Die Gesamtradioaktivität der ersten Auftrennung (1.Dünnschichtchromatografie) gemessen in counts pro minute (cpm) der einzelnen Bereiche und summiert, wurde als 100 % gesetzt.

Die Aktivität dieser ersten Trennung entsprach 45 bis 54 % der mit der ^{3}H-Pregnenolon-Zugabe erreichten Ausgangsradioaktivität (Recovery).

Die Einzelwerte der 2. Dünnschichtchromatografie bzw. der Papierchromatografie wurden auf den Prozentwert der entsprechenden Bereiche der 1. Dünnschichtchromatografie zurückgerechnet.

Einen tabellarischen Überblick geben die Tabellen VI und VII auf den beiden folgenden Seiten 23 und 24.

Die Ergebnisse geben also die Prozentwerte wieder, die die einzelnen Steroide im Testosteronmetabolismus nach zweistündiger Inkubation repräsentieren unter Einbeziehung nichtidentifizierter Substanzen.

Tabelle VI: Ergebnisse der Normaltiere (Kontrollgruppe)

Zahlenwert = prozentualer Anteil an der Gesamtradioaktivität (%)

Steroid	Altersgruppen						
	20 Tage	27 Tage	39 Tage	49 Tage	60 Tage	69 Tage	94 Tage
Pregnenolon	1,478	0,502	13,406	6,003	5,397	10,528	0,603
17-OH-Pregnenolon	3,530	13,381	9,783	13,109	15,723	31,375	3,072
DHA	0,461	1,853	0,464	0,732	1,154	2,679	1,268
Androst-5-en-diol	0,476	0,851	1,494	0,960	0,471	0,752	0,218
Progesteron	0,525	0,788	1,261	0,467	0,409	0,337	0,522
17-OH-Progesteron	2,851	4,054	2,245	4,262	3,780	3,338	5,167
Androst-4-en-dion	16,840	27,556	7,398	7,965	12,642	13,224	7,383
Testosteron	5,471	6,064	15,747	25,697	30,638	24,866	53,869
Androstandion	0,155	0,914	0,240	0,210	0,127	0,155	0,081
Androsteron	26,671	22,571	10,680	5,187	5,338	3,332	11,201
DHT	2,135	1,904	1,889	1,679	0,650	0,275	0,979
Androstandiol	16,169	8,801	24,383	17,426	6,214	4,08o	2,437
unbekannter Bereich	7,879	8,028	7,440	12,645	10,169	12,358	10,997

Alle Zahlenwerte in %

Tabelle VII: Ergebnisse der kryptorchen Tiere (4 Tage Kryptorchismus)

Zahlenwert = prozentualer Anteil an der Gesamtradioaktivität (%)

Steroid	Altersgruppen						
	20 Tage	27 Tage	39 Tage	49 Tage	60 Tage	69 Tage	94 Tage
Pregnenolon	0,671	1,274	8,676	4,511	7,014	1,161	0,492
17-OH-Pregnenolon	13,476	15,871	15,152	16,821	13,895	13,406	6,508
DHA	1,533	1,195	1,231	3,173	0,640	1,787	1,288
Androst-5-en-diol	0,803	1,131	1,422	1,857	0,868	0,830	1,302
Progesteron	0,732	0,257	0,493	0,316	1,122	0,366	0,476
17-OH-Progesteron	2,057	3,353	6,324	3,478	4,265	1,828	1,562
Androst-4-en-dion	17,879	30,182	14,842	11,817	10,362	15,538	12,470
Testosteron	7,784	5,073	14,143	21,722	33,917	30,547	52,003
Androstandion	0,069	0,335	0,370	0,255	0,233	0,134	0,095
Androsteron	26,558	21,685	7,186	6,718	2,920	7,106	5,163
DHT	6,734	1,801	1,773	2,121	2,000	2,356	1,467
Androstandiol	10,374	7,168	12,404	9,562	7,241	10,656	3,398
unbekannter Bereich	8,550	7,378	10,651	14,671	9,919	11,887	11,455

Alle Zahlenwerte in %

4.2 Ergebnisse der 20 Tage alten Tiere Abb.7 S.31

Sowohl die kryptorchen Tiere (0,671 %) als auch die Kontrollgruppe mit 1,478 % metabolisierten PREGNENOLON sehr gut.
17-OH-PREGNENOLON liegt bei der kryptorchen Gruppe mit 13,476 % im Bereich der anderen Altersgruppen, die Kontrollgruppe mit 3,530 % erheblich niedriger. Bei DHA liegt der Anteil bei den kryptorchen Tieren mit 1,533 % etwa ein Prozent höher als bei den Normaltieren (0,461 %). ANDROSTENDIOL mit 0,803 % für kryptorche und 0,476 % für normale Tiere und PROGESTERON mit 0,732 % und 0,525 % (Krypt./norm.) liegen unter einem Prozent.
Bei 17-OH-PROGESTERON liegt der Kontrollwert (2,851 %) über dem Wert der kryptorchen Tiere (2,057 %).
In dieser Altersgruppe finden sich die zweithöchsten Werte für ANDROSTENDION (17,879 % Krypt./16,840 % norm.), dazu korrelierend die zweitniedrigsten Werte für TESTOSTERON (7,784 % Krypt./5,471 % normal).
Das Testosteronabbauprodukt ANDROSTANDION mit 0,069 % krypt. und 0,155 % normal ist wie auch in den anderen Altersstufen nur in geringen Mengen vorhanden, während ANDROSTERON mit 26,558 % (Krypt.) und 26,671 % (Norm.) absolute Höchstwerte erzielte. Die Anteile von DHT mit 6,734 % bei kryptorchen und 2,135 % bei Normaltieren stellen ebenfalls Höchstwerte dar. ANDROSTANDIOL schließlich ist bei dieser jüngsten Altersgruppe bei den Kontrolltieren mit 16,169 % gegenüber 10,374 % (Krypt.) deutlich höher.

Im direkten Vergleich beider Tiergruppen fällt vor allem der um das Vierfache niedrigere 17-OH-PREGNENOLON-Wert der Normalgruppe auf. Auch ANDROSTANDIOL wird erheblich mehr bei der Normalgruppe gefunden, wogegen PREGNENOLON, 17-OH-PROGESTERON, und ANDROSTANDION nur geringfügig höhere Normalwerte aufweisen. ANDROSTENDION , TESTOSTERON und DHT liegen bei bei den kryptorchen Tieren höher, ANDROSTERON nahezu gleich.

Abbildung 7 auf Seite 31 zeigt die grafische Darstellung des Steroidspektrums.

4.3 Ergebnisse der 27 Tage alten Tiere Abb.8 S.32

Das Gesamtbild dieser zweiten , pubertären Gruppe gleicht im Wesentlichen dem der 20 Tage alten Tiere.
PREGNENOLON wird von den kryptorchen Tieren mit 1,274 % gegenüber 0,502 % etwas besser umgesetzt. Der 17-OH-PREGNENOLON-Anteil der kryptorchen Hoden ist mit 15,871 % wiederum höher als der Kontrollwert mit 13,381 %.
DHA mit 1,195 % (krypt.) wird bei den Normaltieren mit 1,853 % in höherem Prozentsatz angetroffen, wogegen ANDROSTENDIOL bei der Kryptorchismusgruppe mit 1,131 % gegenüber 0,851 % etwas höher ausfällt.
PROGESTERON (0,257 % Krypt./0,788 % norm.) und 17-OH-PROGESTERON (3,353 % krypt./4,054 % norm.) liegen in den Kontrollwerten höher.
ANDROSTENDION erreicht absolute Höchstwerte (30,182 % Krypt./27,556 % norm.); den grösseren Androstendionanteil gekoppelt mit einem geringeren TESTOSTERON-Wert finden wir bei den Ratten nach 4 Tagen Hodenhochstand (5,073 % krypt./6,064 % norm.).
In der Reihe der katabolen Testosteronumwandlungsprodukte treffen wir auf höhere Normalwerte : ANDROSTANDION (0,335 % krypt./0,914 % norm.) erreicht sogar einen Spitzenvergleichswert, während ANDROSTERON mit 21,685 % für kryptorche und 22,571 % für extraabdominale Hoden etwa gleiche Werte wie die jüngste Altersgruppe aufweist.
DHT (1,801 krypt./1,904 % norm.) und ANDROSTANDIOL (7,168 % krypt./ 8,801 % norm.) liegen unter den Werten der ersten , 20 Tage alten Tiere.

Abbildung 8 auf Seite 32 gibt einen grafischen Überblick über diese Werte.

4.4 Ergebnisse der 39 Tage alten Tiere Abb.9 S.33

Bei dieser spätpubertären Altersgruppe treten nun einige signifikante Änderungen auf.
PREGNENOLON wird mit 8,676 % bei kryptorchen Hoden etwas besser als bei den unbehandelten Hoden mit 13,406 % metabolisiert; beide Werte stellen im Gesamtvergleich Spitzenwerte dar, zeugen also von einer schlechten Substratnutzung. Der 17-OH-PREGNENOLON-Anteil liegt bei kryptorchen Tieren mit 15,152 % über dem Normalwert von 9,783 %.

DHA liegt bei 1,231 % (Krypt.) ebenfalls höher als der Normalwert mit 0,464 %, wogegen ANDROSTENDIOL bei den unbehandelten Kontrolltieren einen absoluten Höchstwert (1,494 % gegenüber 1,422 % Krypt.) markiert. Der Prozentsatz für die Tiere mit Hodenhochstand repräsentiert einen 2. Platz im Gesamtvergleich.
PROGESTERON zeigt mit 1,261 % (Norm.) wieder einen höheren Wert als kryptorche Hoden (0,493 %); 17-OH-PROGESTERON erreicht einen Spitzenwert mit 6,323 % bei Ratten mit Hodenhochstand, wobei der Parallelwert (2,245 %) niedrig bleibt.
Der Anteil von ANDROSTENDION fällt unter Beibehaltung der Führung des Kryptorchismuswertes auf 14,842 % bzw. 7,398 % zurück, wogegen TESTOSTERON mit einem grösseren Normalwert von 15,747 % gegenüber 14,143 % kräftig ansteigt im Vergleich zur Vorgruppe.
Mit Ausnahme von ANDROSTANDION (Krypt. 0,370 %/Norm. 0,240 %) dominiert in der Reihe des katabloen Testosteronmetabolismus die Gruppe der Normaltiere, wobei ANDROSTERON (7,186 % Krypt./10,680 % Norm.) im Vergleich zu den 27 Tage alten Tieren weiter zurückgeht, DHT (1,773 % Krypt./1,889 % Norm.) konstant bleibt und ANDROSTANDIOL mit 12,404 % bei kryptorchen Hoden ebenso wie bei normalen Hoden (24,383 %) Spitzenwerte erreicht.

Abbildung 9 auf Seite 33 gibt einen grafischen Überblick über die Werte dieser Altersgruppe.

4.5 Ergebnisse der 49 Tage alten Tiere vgl. Abb.10 S.34

PREGNENOLON wird von den kryptorchen Tieren mit 4,511 % gegenüber 6,003 % wiederum besser umgesetzt, der 17-OH-PREGNENOLON-Anteil bleibt bei einem höheren kryptorchen Wert und erreicht mit diesen 16,821 % einen absoluten Höchstwert (Norm. 13,109%). Auch DHA hat in dieser Altersgruppe bei den operierten Ratten einen Spitzenwert von 3,173 % zu verzeichnen (Norm. 0,732 %), ebenso ANDROSTENDIOL mit 1,857 % gegenüber dem Normalwert 0,960 %.
Die Werte für PROGESTERON und 17-OH-PROGESTERON liegen bei der Kontrollgruppe beide höher als bei den operierten Ratten : PROGESTERON 0,316 % Krypt./0,467 % Norm. ; 17-OH-PROGESTERON 3,478 % Krypt./4,262 % Norm.)

ANDROSTENDION geht beim gewohnt höheren kryptorchen Wert weiter auf 11,817 % (Krypt.) zurück, während der Normalwert mit 7,965 % steigende Tendenz verzeichnet.
TESTOSTERON steigt -der Normalwert liegt wiederum höher (25,679 %)- auf 21,722 % (Krypt.) an.
Im katabolen Testosteronmetabolismus liegen im Bereich des 17-Keto-Weges nun beide krypt. Werte über den Normalwerten : ANDROSTANDIOL Krypt. 0,255 %/0,210 % Norm. ; ANDROSTERON Krypt. 6,718 %/5,187 % Norm. DHT liegt bei den kryptorchen Ratten auf 2,121 % gegenüber 1,679 %. Der Anteil ANDROSTANDIOLS im Steroidspektrum ist bei einem Normalwert von 17,426 % noch erheblich über dem prozentualen Anteil der Parallelgruppe (9,562 %).

Abbildung 10 auf Seite34 gibt über die prozentuale Verteilung in dieser Altersgruppe einen Überblick.

4.6 Ergebnisse der 60 Tage alten Tiere Abb.11 S.35

PREGNENOLON wird in dieser Altersgruppe mit 7,014 & (Krypt.) und 5,397 % (Norm.) wiederum etwas schlechter metabolisiert; liegt hier der Anteil bei den kryptorchen Ratten höher, so liegt er bei 17-OH-PREGNENOLON - eine Verdrehung des bisherigen Bildes - mit 13,895 % (Krypt.) und 15,723 % (Norm.) niedriger.
ANDROSTENDIOL liegt mit dem Normalwert 0,471 % wie bisher unter dem Wert der kryptorchen Tiere (0,868 %), wogegen DHA ab dieser Altersstufe höhere Kontrollwerte aufweist (Krypt.0,640/Norm. 1,154 %).
PROGESTERON (Krypt. 1,122 %/0,409 % Norm.) und 17-OH-PROGESTERON (Krypt. 4,265 %/3,780 % Norm.) liegen bei Kryptorchismus von vier Tagen Dauer in höherem Spiegel vor. ANDROSTENDION erreicht bei der kryptorchen Gruppe einen absoluten Tiefstand von 10,362 %, wogegen der Normalwert mit 12,642 % erstmals über dem Parallelwert liegt.
TESTOSTERON bietet in dieser Altersgruppe die zweithöchsten Werte mit 33,917 % (Krypt.) und 30,638 % (Norm.), es stellt neben 17-OH-Pregnenolon und Androstendion den Hauptanteil im Steroidspektrum der Altersstufe. Mit Ausnahme von ANDROSTERON - hier ist ein Kontrollwert von 5,338 über dem Kryptorchismusanteil von 2,920 % zu verzeichnen - liegen im katabolen Testosteronmetabolismus die Werte der kryptorchen Hoden über den Parallel-

zahlen : ANDROSTANDION 0,223 % Krypt./ 0,127 % Norm.; DHT 2,000 % Krypt. 0,650 % Norm.; ANDROSTANDIOL fällt auch im Vergleich zu den jüngeren Altersgruppen noch weiter ab auf 7,241 % (Krypt.) bzw. 6,214 % (Norm.).

4.7 Ergebnisse der 69 Tage alten Tiere Abb.12 S.36

Im Vergleich zur vorausgehenden Altersgruppe sind die Unterschiede nicht sehr groß, abgesehen von der schlechten PREGNENOLON-Utilisation der Kontrollgruppe (10,528 % / 1,161 % Krypt.). Auch der Spitzenwert von 17-OH-PREGNENOLON in der Normaltiergruppe von 31,375 % (13,406 % Krypt.) fällt aus dem Rahmen. Mit Ausnahme von DHA (Krypt. 1,787 %/ Norm. 2,679 %), 17-OH-PROGESTERON (Krypt. 1,828 %/ Norm. 3,338 %) und ANDROSTANDION (Krypt. 0,134 % / Norm. 0,155 %) liegen die Werte für kryptorche Tiere über den Werten der Kontrolltiere.
ANDROSTENDIOL liegt mit 0,830 % (Krypt.) und 0,752 % (Norm.) etwa auf dem Niveau der Altersgruppe 60 Tage alter Tiere, PROGESTERON hat einen Anteil von 0,366 % (Krypt.) bzw. 0,377 % (Norm.). ANDROSTENDION liegt mit 15,538 % (Krypt.) und 13,224 % (Norm.) über den Werten der vorigen Altersgruppe, wogegen TESTOSTERON mit 30,543 % (Krypt.) und 24,866 % (Norm.) etwas niedriger liegt.
ANDROSTERON (7,106 % Krypt./ 3,332 % Norm.), DHT (2,356 % Krypt./ 0,275 % Norm.) und schließlich auch ANDROSTANDIOL (10,656 % Krypt./ 4,080 % Norm.) liegen mit diesen Werten höher als die 9 Tage jüngeren Tiere, wobei die Kontrollwerte unter den Vergleichswerten der Vorgruppe rangieren.

Abbildung 12 auf Seite 36 gibt eine grafische Übersicht über die Einzelwerte dieser Altersgruppe.

4.8 Ergebnisse der 94 Tage alten Tiere Abb.13 S.37

Hier fällt vor allem der TESTOSTERON-Spitzenwert von 52,003 % (Krypt.) und 53,869 % (Norm.) auf; der Wert der Kontrolltiere stellt den höchsten Testosteronanteil der Untersuchungen dar. ANDROSTENDION liegt mit 12,470 % und 7,383 % (Norm.) niedrig, wobei der kryptorche Wert über dem Normalwert liegt. PREGNENOLON wird von beiden Tierarten gut umgesetzt, es bleiben Restwerte von 0,492 % (Krypt.) und 0,603 % (Norm.).

17-OH-PREGNENOLON hat bei den kryptorchen Tieren mit 6,508 % gegenüber den nicht operierten Tieren mit 3,072 % einen höheren Anteil. Gleiches gilt für DHA (1,288 % Krypt./ 1,268 % Norm.) und ANDROSTENDIOL (1,302 % Krypt./ 0,218 % Norm.).
Im Bereich des Δ-4-Weges liegen für PROGESTERON und 17-OH-PROGESTERON die Kontrollgruppenanteile höher, Progesteron (0,476 % Krypt./ 0,522 % Norm.) ; 17-OH-Progesteron (1,562 % Krypt. / 5,167 % Norm. - letzteres ist Spitzenwert). Im Bereich des 17-Keto-Weges gilt für ANDROSTANDION ein geringfügig höherer Kryptorchismuswert von 0,095 % gegenüber 0,081 % (Norm.), der ANDROSTERON-Anteil liegt jedoch mit 5,163 % (Krypt.) erheblich unter dem Normalwert von 11,201 %.
DHT nimmt in dieser Altersgruppe noch weiter ab auf 1,467 % (Krypt.) und 0,979 % (Norm.). ANDROSTANDIOL schließlich bietet die niedrigsten Werte aller Altersgruppen unter Führung des kryptorchen Anteils (3,398 %) bei 2,437 % für die Normaltiere.
Abbildung 13 auf Seite 37 gibt einen grafischen Überblick über die prozentualen Anteile der einzelnen Steroide am Gesamtspektrum.

Eine grafische Übersicht einzelner Steroide des Testosteronmetabolismus in Beziehung zu den Altersgruppen geben die Abbildungen 14 bis 25 auf den Seiten 38 bis 43.

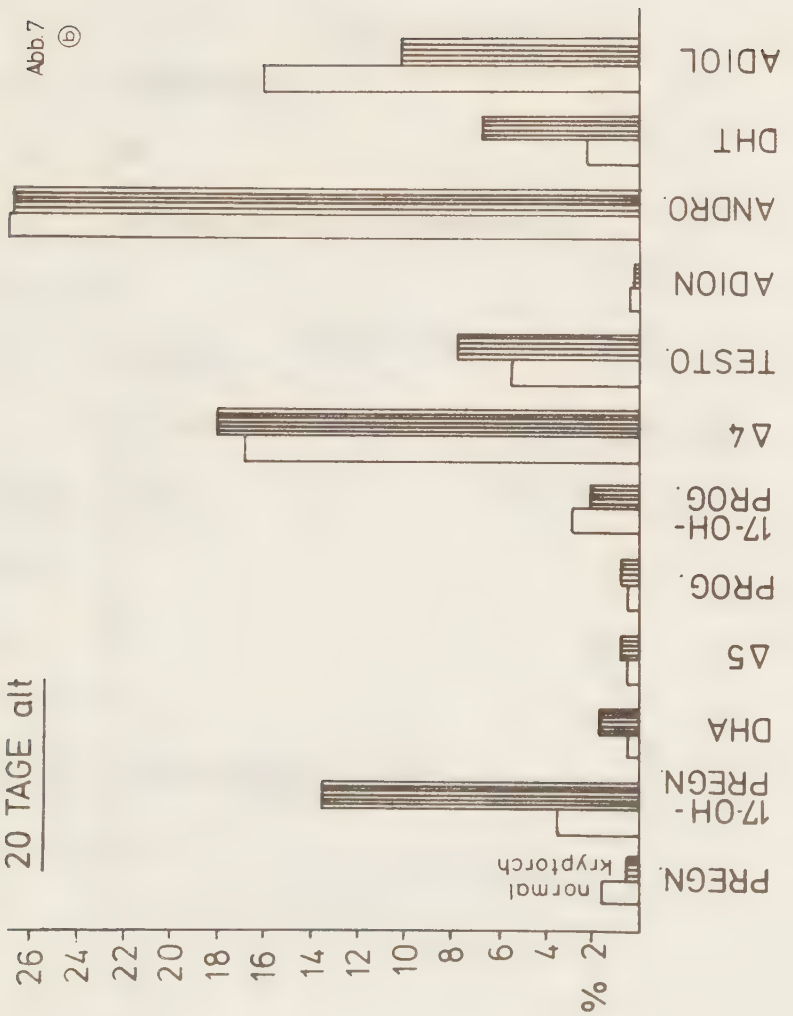


Abbildung 7: Grafische Darstellung des Steroidspektrums im Testosteronmetabolismus bei 20 Tage alten normalen und kurzzeitig kryptorchen Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

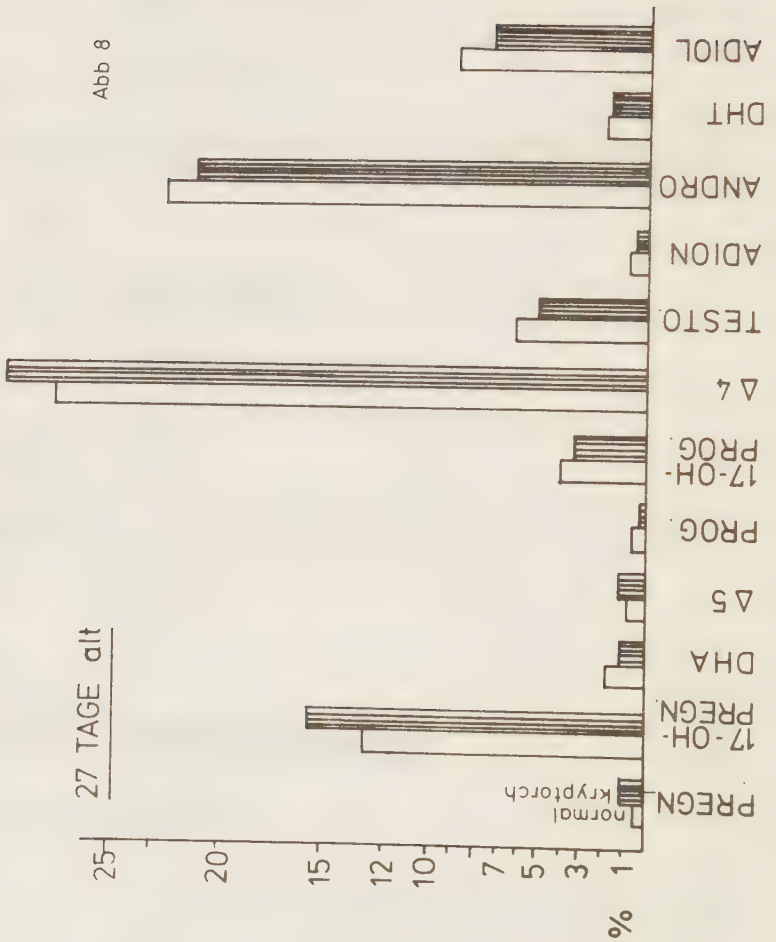


Abbildung 8: Grafische Darstellung des Steroidspektrums im Testosteron-metabolismus bei 27 Tage alten normalen und kurzzeitig kryptorchen Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

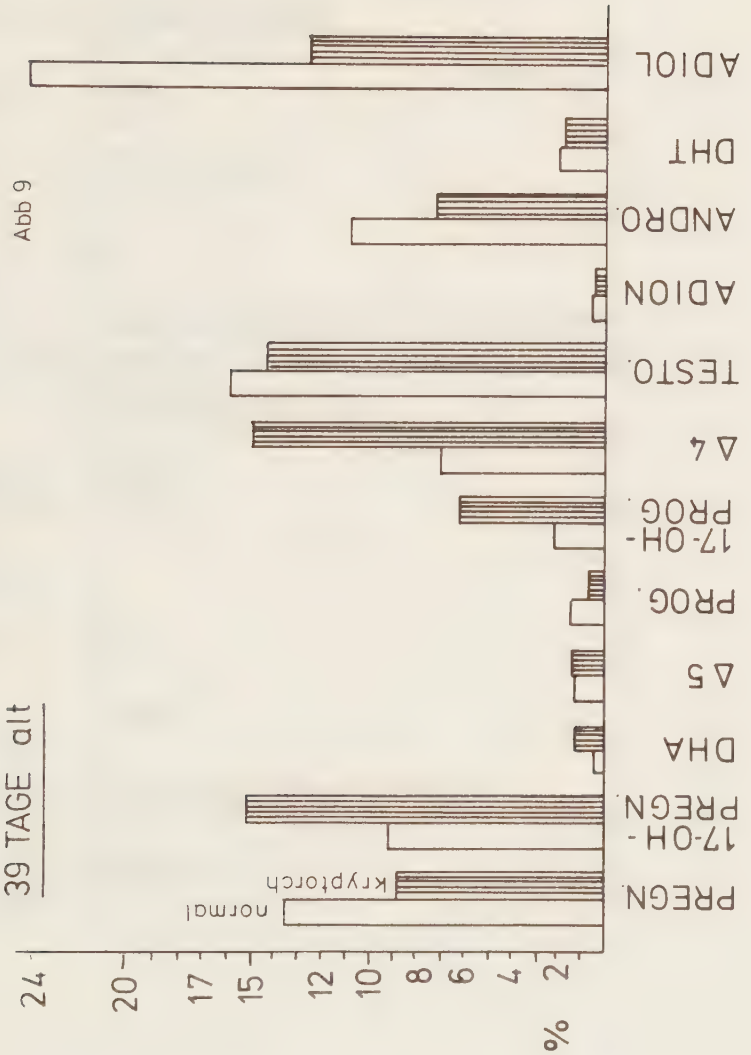


Abbildung 9: Grafische Darstellung des Steroidspektrums im Testosteron-metabolismus bei 39 Tage alten normalen und kurzzeitig kryptorchen Ratten nach Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

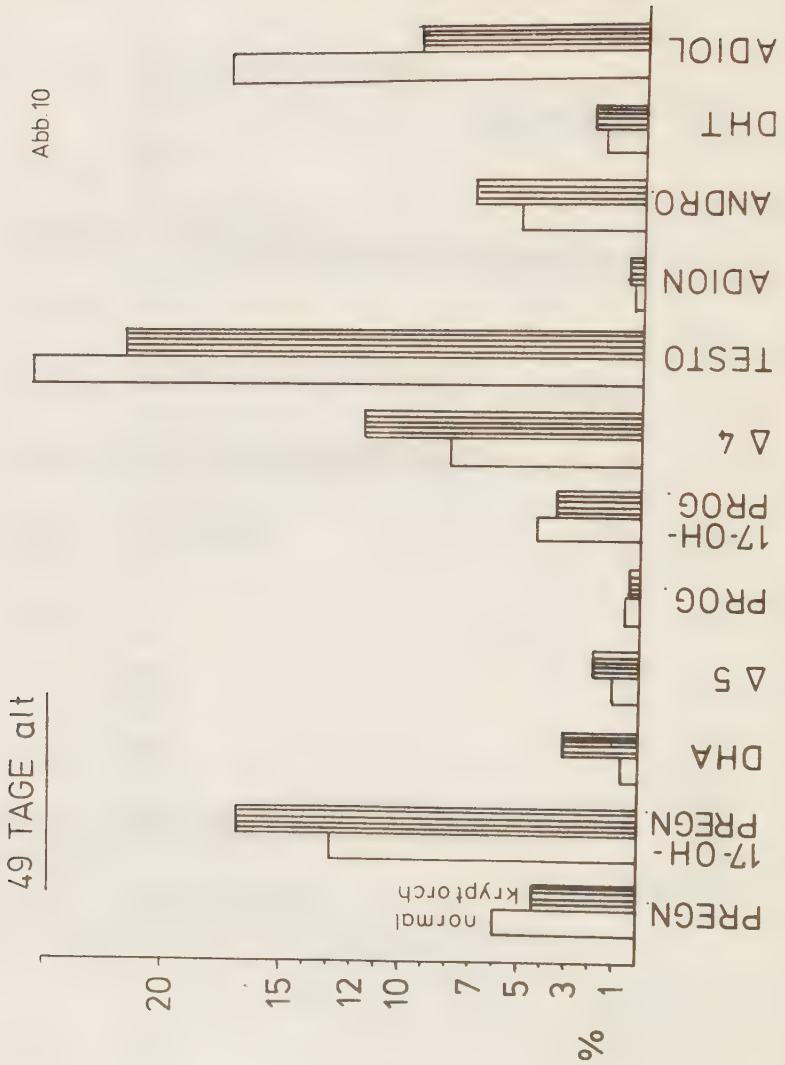


Abbildung 10: Grafische Darstellung des Steroidspektrums im Testosteronmetabolismus bei 49 Tage alten normalen und kurzzeitig kryptorchen Ratten nach Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

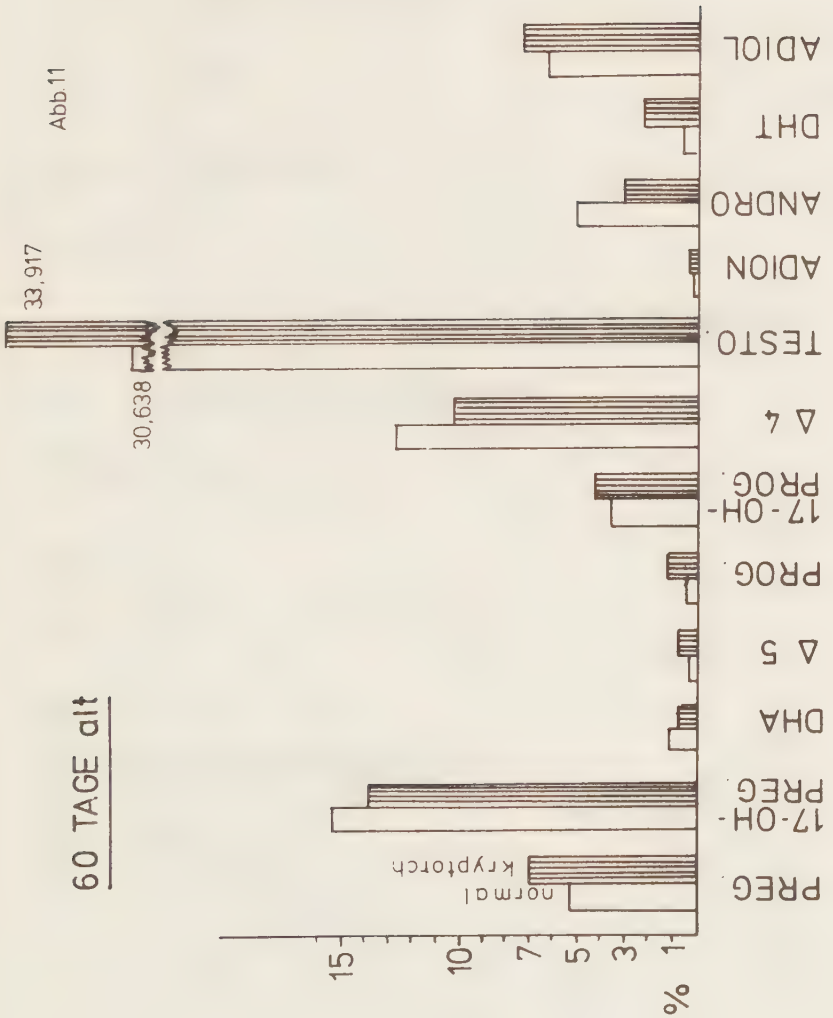


Abbildung 11: Grafische Darstellung des Steroidspektrums im Testosteronmetabolismus bei 60 Tage alten normalen und kurzzeitig kryptorchen Ratten nach Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

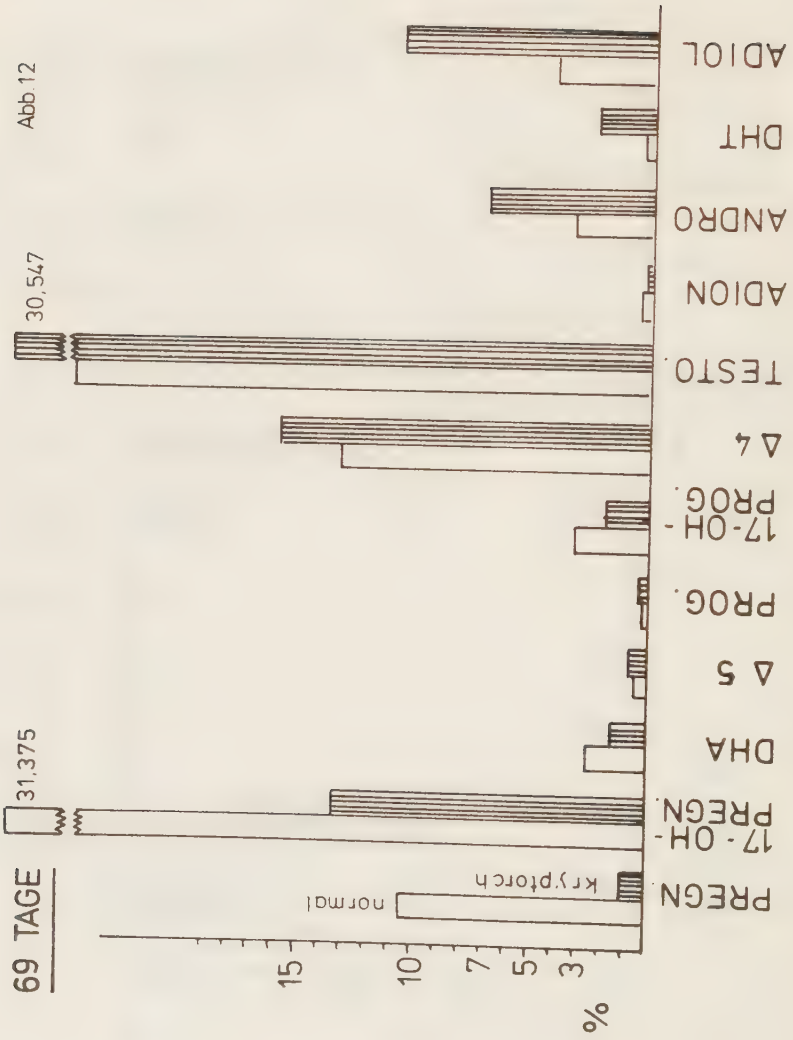


Abbildung 12: Grafische Darstellung des Steroidspektrums im Testosteronmetabolismus bei 69 Tage alten normalen und kurzzeitig kryptorchen Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

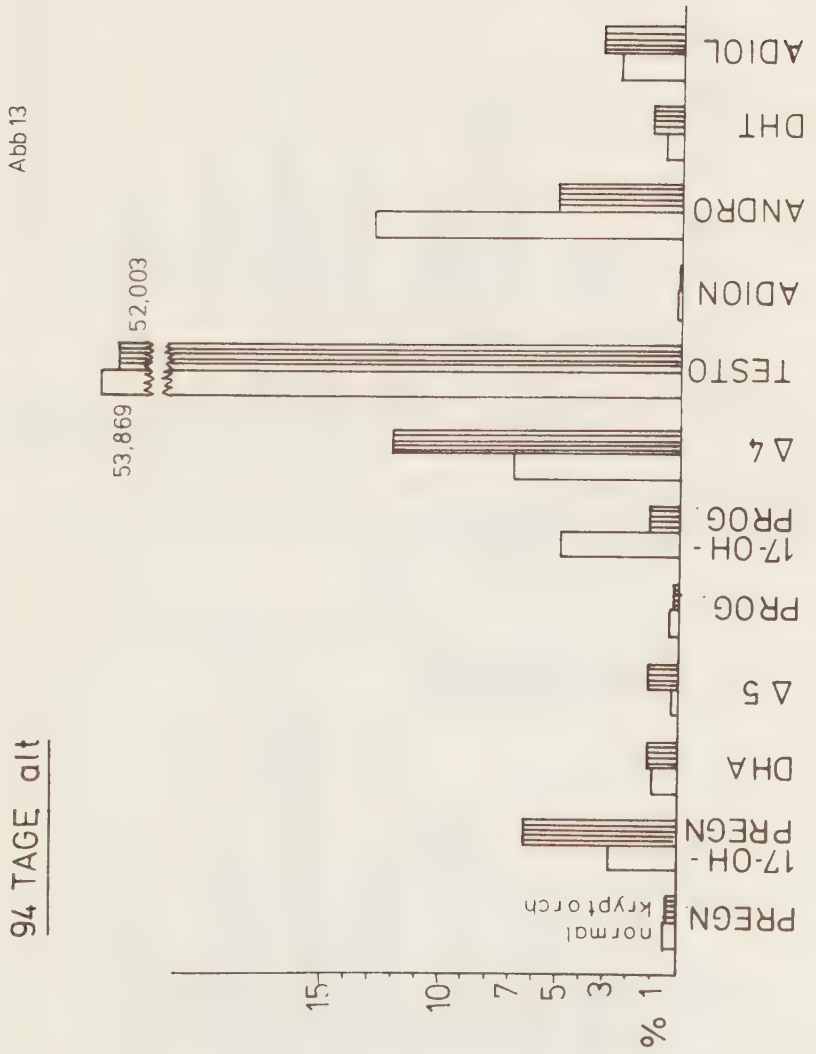


Abbildung 13: Grafische Darstellung des Steroidspektrums im Testosteronmetabolismus bei 94 Tage alten normalen und kurzzeitig kryptorchen Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

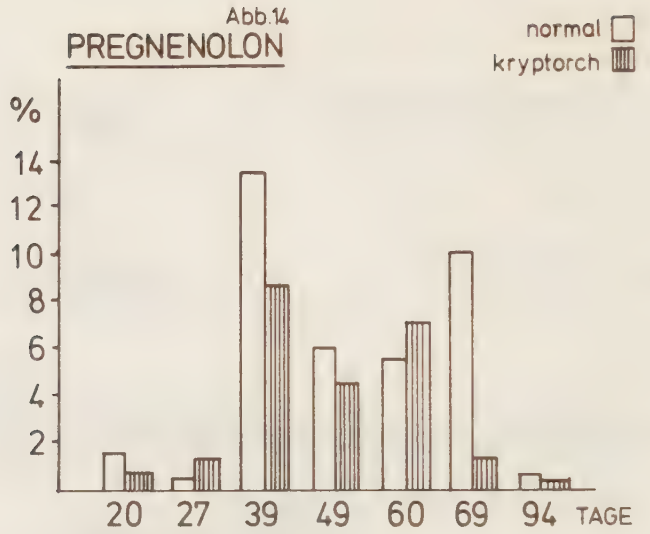


Abbildung 14: PREGNENOLON. Grafische Darstellung der Einzelwerte in verschiedenen Altersstufen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

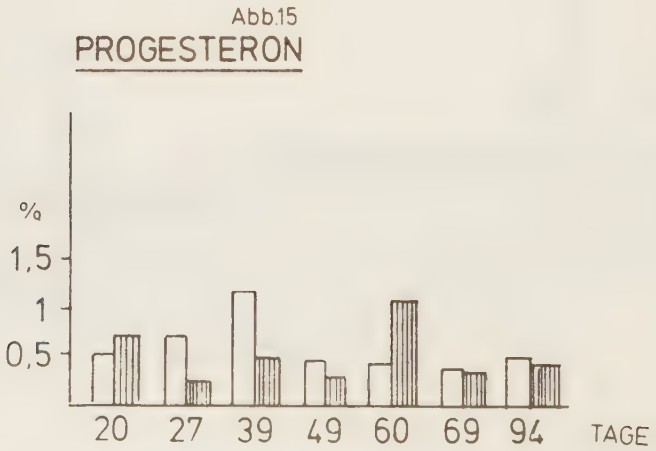


Abbildung 15: PROGESTERON. Grafische Darstellung der Einzelwerte in verschiedenen Altersstufen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

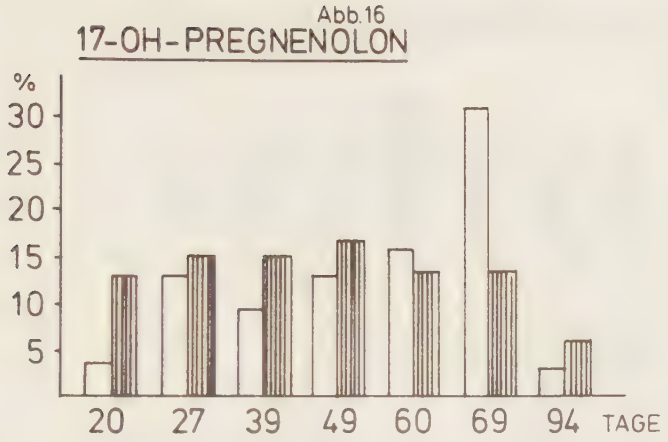


Abbildung 16: 17-OH-PREGNENOLON. Grafische Darstellung der Einzelwerte in verschiedenen Altersstufen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

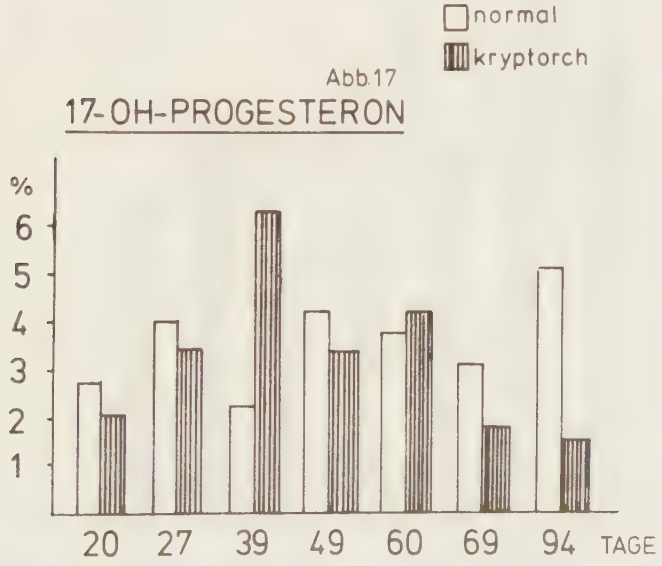
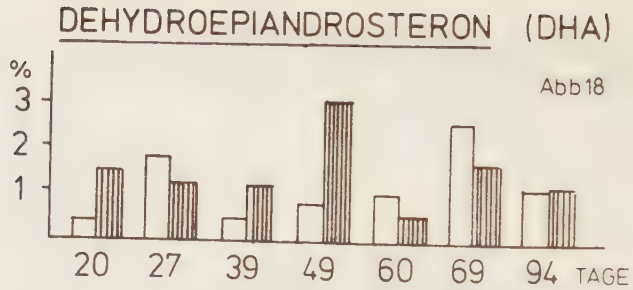


Abbildung 17: 17-OH-PROGESTERON. Grafische Darstellung der Einzelwerte in verschiedenen Altersstufen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.



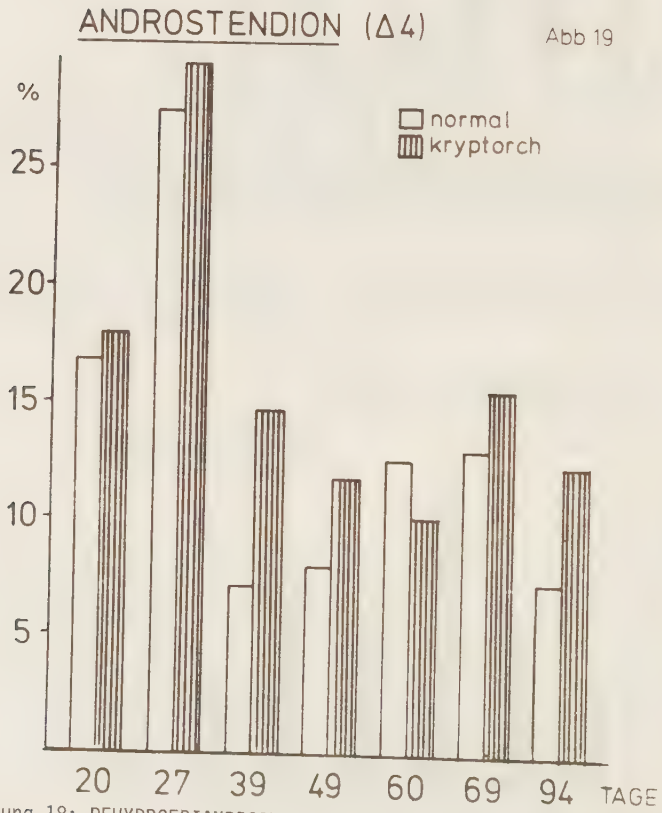


Abbildung 18: DEHYDROEPIANDROSTERON.
Abbildung 19: ANDROST-4-EN-DION. Grafische Darstellung der Einzelwerte in verschiedenen Altersstufen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation mit Pregnenolon.

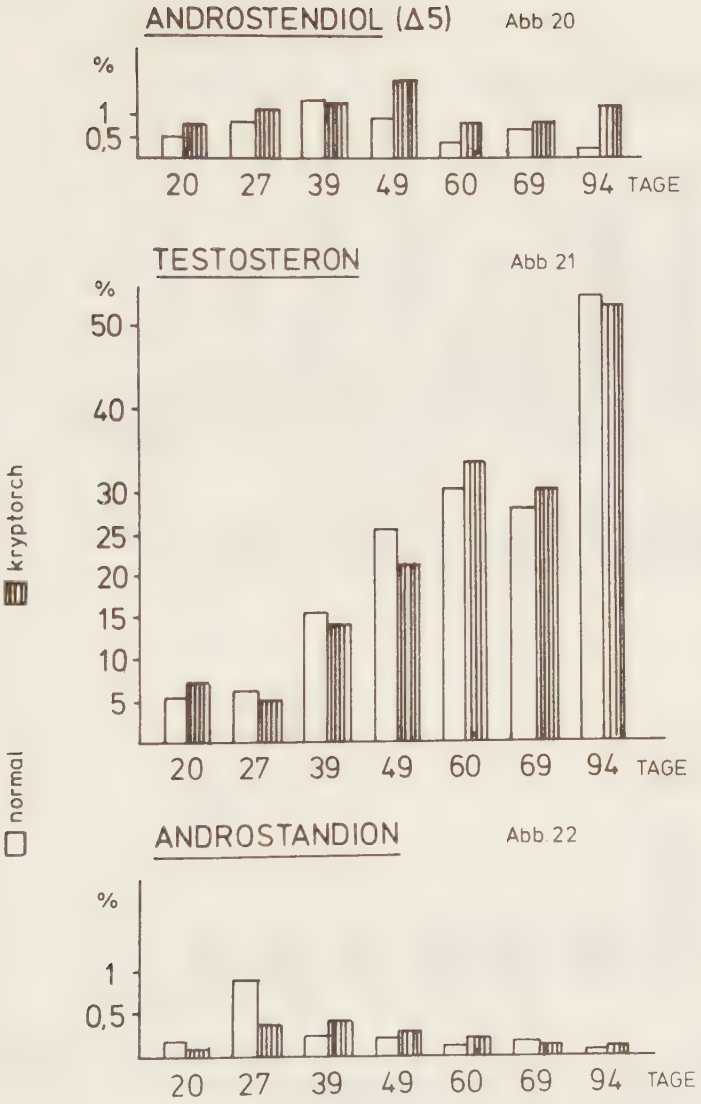


Abbildung 20: ANDROST-5-EN-DIOL
Abbildung 21: TESTOSTERON
Abbildung 22: ANDROSTANDION Grafische Darstellungen der Einzelwerte in verschiedenen Altersstufen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

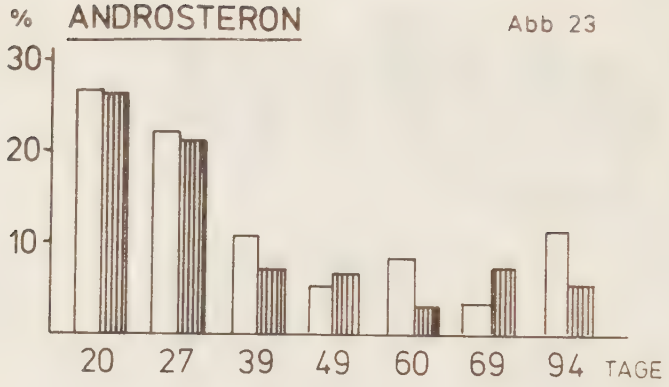


Abbildung 23: ANDROSTERON. Grafische Darstellung der Einzelwerte in verschiedenen Altersstufen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

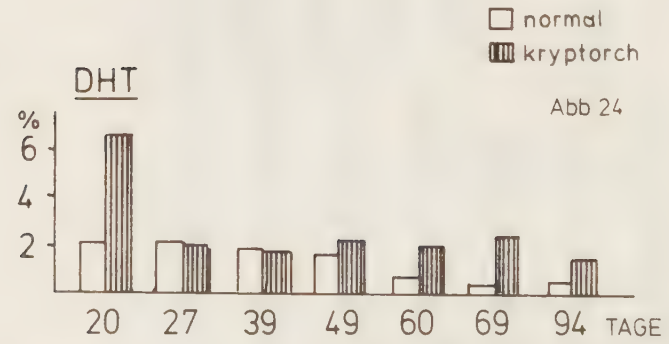


Abbildung 24: DHT. Grafische Darstellung der Einzelwerte in verschiedenen Altersstufen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

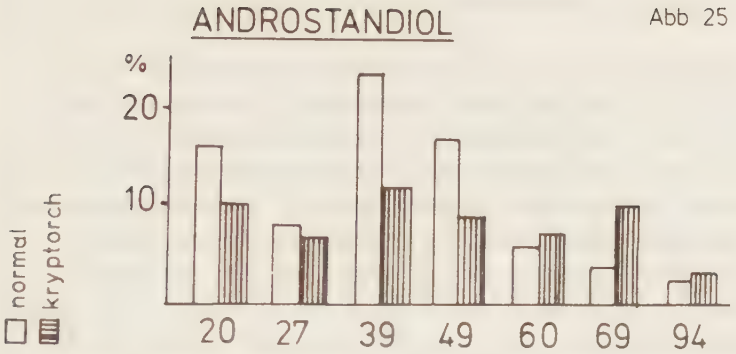


Abbildung 25: ANDROSTANDIOL. Grafische Darstellung der Einzelwerte in verschiedenen Altersstufen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

4.9 Relation zwischen Androst-4-en-dion und Testosteron

Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den kurzzeitig artifiziell kryptorchen Ratten finden wir in der Altersgruppe 27 Tage die höchsten Androsten-4-dionwerte gekoppelt mit sehr niedrigen Testosteronwerten. Dies zeichnet diese sich in der Pubertät befindenden Tiere aus, da gleichzeitig der Quotient Σ 5α-Reduzierte Steroide / Testosteron adäquat ist. Der Quotient Androst-4-en-dion/Testosteron beträgt bei den Normaltieren in der 27 Tage alten Gruppe 4,544 , bei den kryptorchen Tieren 5,950.
Bleibt bei den kryptorchen Tieren dieser Quotient auch bei den 39 Tage alten Tieren noch knapp >1 (1,049), so liegt er bei den Kontrolltieren in dieser Altersgruppe bereits unter 1 (0,470).
Tabelle VIII auf Seite 48 gibt einen Überblick über die Quotienten, Abbildung 26 zeigt eine grafische Darstellung.

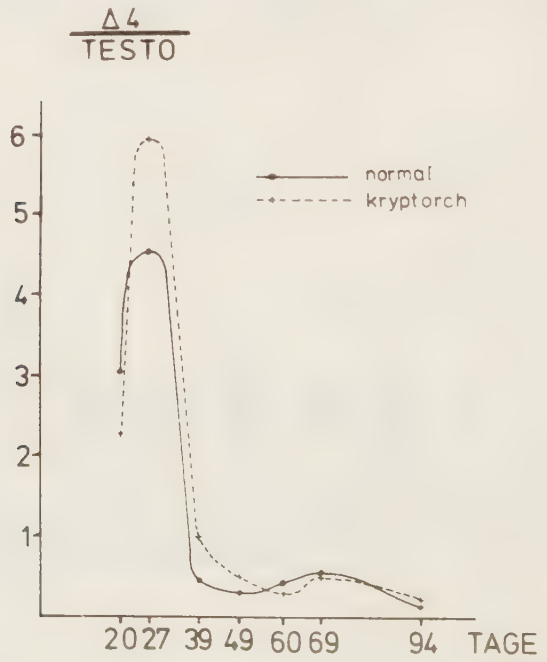


Abbildung 26: Grafische Darstellung des Quotienten $\frac{\text{Androst-4-en-dion}}{\text{Testosteron}}$

4.10 Relation zwischen Androsteron und Testosteron

Im 17-Keto-Weg bietet sich ein ähnliches Bild wie im 17-OH-Weg: der steil abfallende Quotient Androsteron/Testosteron liegt bereits in der 39 Tage alten Tiergruppe unter 1 - Ausdruck dafür, daß mit Erreichen der sexuellen Reifung der Anteil Androsterons zugunsten von Testosteron zurückgeht. Der Quotient für kryptorche Hoden bewegt sich uneinheitlich über (Altersgruppen 27, 49 und 69 Tage) oder unter dem Wert der Kontrollgruppe. Auffallend an der präpubertären Tiergruppe ist der Kurvenanstieg, bedingt durch schon in dieser Gruppe höhere Testosteronwerte, der sich bei den kryptorchen Tieren darstellt.

Tabelle VIII auf Seite 48 gibt die Werte der einzelnen Quotienten in verschiedenen Altersstufen an. Abbildung 27 unten zeigt eine grafische Darstellung.

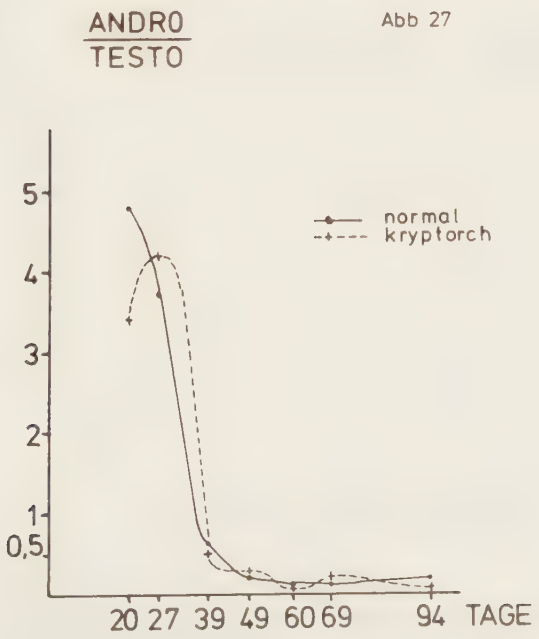


Abbildung 27: Grafische Darstellung des Quotienten $\frac{\text{Androsteron}}{\text{Testosteron}}$. Werte einzelner Altersgruppen normaler und kurzzeitig artifiziell kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

4.11 Relation zwischen Androstandiol und Testosteron

Dieser Quotient ist Ausdruck des Testosteronmetabolismus im 17-OH-Weg. Bis zur spätpubertären Normaltiergruppe (39 Tage alt) ist der Quotient beider Steroide >1 - Ausdruck für den zu späteren Gruppen offensichtlich forcierten Testosteronkatabolismus. Ab der 49 Tage alten Tiergruppe steigt jedoch der Testosteronanteil zu Lasten des Androstandiol stark an , so daß der Quotient <1 wird.
Bei 4 Tage kurzfristig kryptorchen Tieren liegt der Quotient schon bei jungen Tieren um 1 und damit deutlich niedriger als bei der Kontrollgruppe, hier herrscht also bei den jungen Tieren schon ein relativ ausgeglichenes Verhältnis zwischen Testosteron und Androstandiol.
Tabelle VIII auf Seite 48 gibt die Einzelwerte des Quotienten Adiol/Testo an.
Abbildung 28 zeigt eine grafische Darstellung.

$\frac{\text{ADIOL}}{\text{TESTO}}$ Abb 28

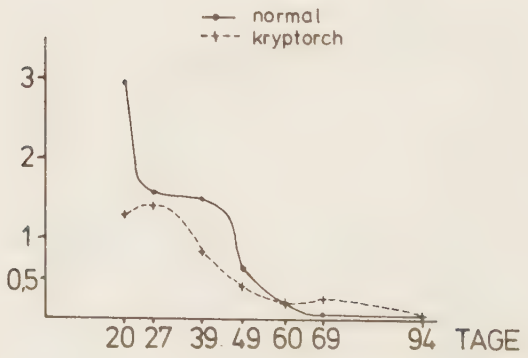


Abbildung 28: Grafische Darstellung des Quotienten $\frac{\text{Androstandiol}}{\text{Testosteron}}$ bei einzelnen Altersgruppen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach Inkubation von 2 Stunden Dauer der Hoden mit Pregnenolon.

4.12 Relation zwischen der Summe der 5α-reduzierten Metabolien und Testosteron

Durch Summation der Werte von DHT und Androstandiol als Repräsentanten des 17-OH-Weges im Testosteronkatabolismus einerseits und von Androstandion und Androsteron als solchen im 17-Keto-Weg andererseits finden wir für beide Tiergruppen in den jüngsten Altersgruppen und der ältesten Gruppe (20,27 und 94 Tage) eine Dominanz im 17-Keto-Weg, vorwiegend bedingt durch hohe Androsteronwerte, wogegen die mittleren Gruppen durch hohe Androstandiolwerte den 17-OH-Weg bevorzugen. Mit Ausnahme der 69 Tage alten Tiere liegen die Summen der Testosteronkataboliten

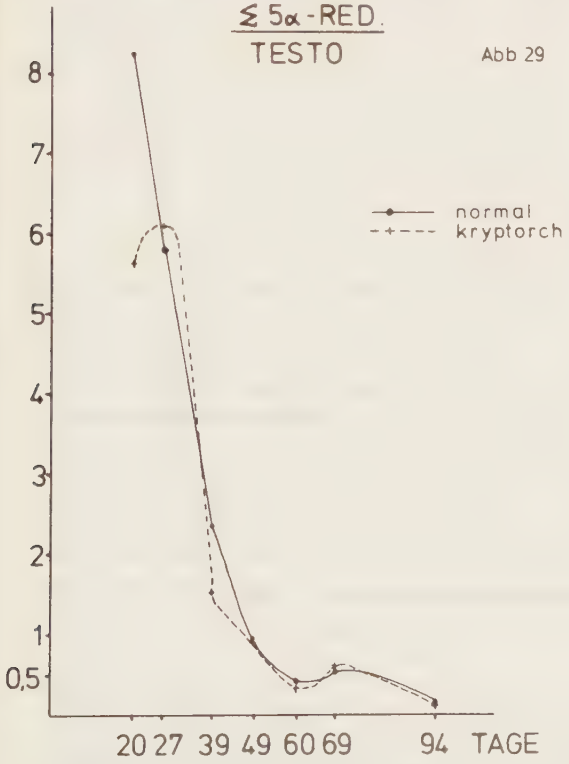


Abbildung 29: Grafische Darstellung des Quotienten $\frac{\Sigma\ 5\alpha\text{-Reduz.Metabol.}}{\text{Testosteron}}$ bei den einzelnen Altersgruppen normaler und kurzzeitig kryptorcher Ratten nach zweistündiger Inkubation der Hoden mit Pregnenolon.

bei den Normaltieren höher als bei den kryptorchen Ratten. Der Quotient Σ 5α-reduzierte Testosteronkatabolite/Testosteron ist im Gegensatz zu den einzelnen Werten erst in der 49 Tage alten Gruppe <1. Auch in der jüngsten kryptorchen Altersgruppe ist ein gebremster Testosteronkatabolismus zu vermerken.

4.13 Gewichtsveränderungen bei 4 Tagen ins Abdomen zurückverlagerten Rattenhoden

Bei kryptorchen Hoden können wir gegenüber den Normalwerten Mindergewichte zwischen -2 % und - 14 % vermerken. Lediglich die Gruppe der 27 Tage alten Tiere verfügt über ein Hodengewicht, das 104 % des Gewichts des normalen Hoden erreicht.

Tabelle VIII:

Quotient $\frac{\text{Androstendion}}{\text{Testosteron}}$							
Altersgruppe	20 Tage	27 Tage	39 Tage	49 Tage	60 Tage	69 Tage	94 Tage
Normaltiere	3,078	4,544	0,470	0,310	0,431	0,532	0,137
Krypt. Tiere	2,297	5,950	1,049	0,544	0,306	0,509	0,239
Quotient $\frac{\Sigma\ 5\alpha\text{-reduz.Metabol.}}{\text{Testosteron}}$							
Normaltiere	8,249	5,803	2,361	0,953	0,402	0,315	0,273
Krypt. Tiere	5,619	6,109	1,537	0,859	0,365	0,622	0,195
Quotient $\frac{\text{Androstandiol}}{\text{Testosteron}}$							
Normaltiere	2,955	1,616	1,548	0,679	0,203	0,164	0,045
Krypt.Tiere	1,333	1,413	0,877	0,440	0,312	0,349	0,065
Quotient $\frac{\text{Androsteron}}{\text{Testosteron}}$							
Normaltiere	4,874	3,722	0,678	0.202	0,174	0,134	0,208
Krypt. Tiere	3,412	4,275	0,508	0,309	0,086	0,233	0,099

5. DISKUSSION

Die Biokonversion von ^{3}H-markiertem PREGNENOLON bei normalen und kurzzeitig artifiziell kryptorchen Ratten im Verlaufe der beiden möglichen Testosteronsynthesewege, dem Δ-4-Weg und dem Δ-5-Weg, sowie im Rahmen des katabolen Testosteronstoffwechsels (17-Keto- und 17-OH-Weg) war Gegenstand vorliegender Untersuchung.

Die Umsetzung des Substrates PREGNENOLON war bei den beiden jüngsten Altersgruppen (20 und 27 Tage alte Tiere) optimal, während die 39 bis 69 Tage alten Tiere im Einzelfall bis zu 10 % Restsubstratmengen aufwiesen.

Die kryptorchen Tiere zeigten im Schnitt eine bessere Substratausnutzung als die Kontrollgruppe. Auch Arnold (1) konnte dies beobachten. Dies kann Ausdruck der von Kormano u.a. (38) beschriebenen globalen Stoffwechselsteigerung bei kryptorchen Hodengeweben sein.

Auffallend hoch dagegen liegen bei beiden Tiergruppen die Werte für 17-OH-PREGNENOLON, das zusammen mit ANDROST-4-EN-DION, TESTOSTERON und den 5α-reduzierten Steroiden ANDROSTERON und ANDROSTANDIOL quantitativ den Hauptanteil am Steroidspektrum ausmacht.

Auch Eik-Nes und Kekre (12) registrierten bei der In-Vivo-Infusion von ^{3}H-PREGNENOLON in die Arteria spermatica von Hunden jeweils hohe 17-OH-PREGNENOLON-Werte, die über den Werten von PROGESTERON lagen.

Oh und Tamaoki (43) beschrieben ebenfalls eine Dominanz dieses Syntheseschrittes gegenüber der Alternative Pregnenolon → Progesteron.

Im weiteren Verlauf des Δ5-Weges finden wir nach Inkubationsende jeweils nur geringe Prozentwerte für DHA und ANDROST-5-EN-DIOL, die sich mit anderen Untersuchungen im Hause (Grumbach,16 ; Hansis,32) decken.

Slaunwhite(53) und Bendrak (3) berichten von einer grundsätzlich begrenzten Umsatzrate der C17,20-Lyase im Δ5-Weg, wofür sowohl die hohen 17-OH-PREGNENOLON- als auch die niederen DHA- und ANDROST-5-EN-DIOL-Werte sprechen. Bei den kryptorchen Tieren liegen die Werte für 17-OH-PREGNENOLON höher als bei den Kontrollgruppen, dasselbe gilt auch für die ANDROST-5-EN-DIOL-Werte. Für letztere könnte die von Inano (35) allerdings erst nach länger dauerndem Kryptorchismus eintretende Erhöhung der 17β-OH-Steroid-Dehydrogenase verantwortlich sein; primär

jedoch erscheinen die in diesem Syntheseweg erhöhten Werte kryptorcher Tiere (DHA gibt allerdings ein uneinheitliches Bild) Ausdruck der von Kormano (38) und später auch von Inano (35) bei Kryptorchismus beschriebenen signifikanten Verminderung der 3β-OH-Steroid-Dehydrogenase zu sein. Nach viertägigem Kryptorchismus ist das Ausmaß dieser Veränderung im Enzymmuster jedoch noch sehr gering.

PROGESTERON und 17-OH-PROGESTERON finden sich in geringen Mengen, wobei erwartungsgemäß 17-OH-PROGESTERON mit höheren Werten erscheint. Altersmäßig finden sich keine großen Unterschiede, wohl aber zeigt sich im Vergleich der kryptorchen Tiergruppe mit der Normalgruppe mit Ausnahme von jeweils 2 Altersstufen (Progesteron : 20 und 60 Tage alte Tiere; 17-OH-Progesteron 39 und 60 Tage alte Tiere) ein Überwiegen von höheren Normalwerten als weiteres Indiz für die oben beschriebene Verminderung der 3β-OH-Steroid-Dehydrogenase-Aktivität.

ANDROST-4-EN-DION stellt mit Werten zwischen 7 % und 30 % einen zweiten Hauptmetaboliten in der Biokonversion des Pregnenolons dar. Bereits bei den 27 Tage alten Tieren finden sich Höchstwerte - im Einvernehmen zu Inano (33), der im Hinblick auf die Testosteronsynthese einen bis zum 50. Tag langsam, ab dann raschen Anstieg der 17β-OH-Steroid-Dehydrogenase beschreibt.
Um ANDROST-4-EN-DION als Substrat konkurriert jedoch auch die $\Delta 4$-5α-Reduktase, für die Inano einen Aktivitätsanstieg zwischen dem 20. und 30. Tag, ein gleichbleibendes Niveau bis zum 40. Tag und dann einen Abfall der Aktivität beschreibt. In der Tat finden sich bei den beiden jüngsten Gruppen höhere Werte für die 5α-reduzierten Steroide des von Androst-4-en-dion ausgehenden 17-Keto-Weges.

Mit Ausnahme des 60.Tages liegen die erzielten Werte für die kryptorchen Tiere bei ANDROST-4-EN-DION über den Normalwerten. Für die von Inano (35) nach allerdings 32tägigem experimentellen Kryptorchismus beobachteten dreifachen Erhöhung der 17β-OH-Steroid-Dehydrogenase findet sich kein Anhalt; so zeigen sich bei Testosteron zwischen den kryptorchen und normalen Tieren nur jeweils geringe Unterschiede bei einer Tendenz zu höheren Normalwerten.

Übereinstimmend sowohl mit Steinberger und Ficher (55) als auch mit Arnold (1) steigen postpubertär die Testosteronwerte rapide an; für die die Erhöhung der 17β-OH-Steroid-Dehydrogenase-Aktivität verantwortlich ist. Auf der anderen Seite korrelieren diese hohen Testosteronwerte mit niederen Androstandiolwerten ebenso wie mit niederen Androsteronwerten, wie auch bei anderen Autoren (Arnold,1 ;Hansis,32 Gupta,21). Ficher (13) findet nach Progesteroninkubation bei 90 Tage alten Tieren kein Androsteron mehr, was sich allerdings weder hier noch bei Grumbach (16) und Arnold (1) ergibt.

Für den Testosteronkatabolismus sind vor allem die 5α-Reduktasen verantwortlich . Der von Rivarola (48) angegebenen maximalen Reduktaseaktivität am 45. Tage bei Ratten kommt die vorliegende Untersuchung mit den höchsten 5α-reduzierten Werten am 39. Tag sehr nahe. Für den von Inano (33) und später auch von Folman (14) gezeigten Aktivitätsverlust der Androst-4-en-5α-Reduktase nach dem 40. Lebenstag spricht die allerdings schon der der 39 Tage alten Tiergruppe vorhandenen Dominanz des 17-OH-Weges.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß DHT bei sämtlichen kryptorchen Altersgruppen über dem Normalwert oder annähernd gleich liegt. Untersuchungen im Plasma von normalen und kryptorchen Ratten von Gupta u.a. (27) ergaben für das Plasma kryptorcher Tiere ausgesprochen niedrige Werte. Wogegen Grumbach (16) wiederum bei Inkubation längerfristig kryptorcher Ratten ebenfalls höhere DHT-Werte gegenüber den Normalwerten verzeichnet. Daß ausgerechnet die metabolisch aktive Form des Testosterons, das DHT, bei kryptorchen Ratten erhöht ist, könnte in der von Gloyna (15) beschriebenen Funktion akzelerierter Zellvorgänge liegen und mithin auch die von Kormano (38) beschriebenen unspezifischen Aktivitätssteigerungen kryptorcher Zellen erklären.

Grundsätzlich zeigen jedoch hier die kryptorchen Tiere eine verminderte Summe aller 5α-reduzierten Steroide. Dafür ist auch das bei kryptorchen Tieren vermindert umgesetzte Androst-4-en-dion maßgebend, das auch in der Relation zu Testosteron -als Index für die Reifung der Tiere- im Sinne einer Reifungsverzögerung bei Tieren mit Hodenhochstand (das heißt: Der Quotient Δ4/Testo >1 bei Normaltieren bis 27 Tage , bei kryptorchen Tieren bis 39 Tage)

verschoben ist.

Wie bei Clegg (6), Davis (9) und Kormano (38) konnte auch in der vorliegenden Untersuchung eine Gewichtsabnahme kryptorcher Hoden registriert werden.

Die Biokonversion von PREGNENOLON unterliegt im Laufe der Reifungsperiode von Ratten im Wesentlichen bestimmten Veränderungen der Enzymkinetik. Junge,präpubertäre Tiere weisen hohe und höchste ANDROST-4-EN-DION-Werte auf und zeigen einen schnellen TESTOSTERON-Umsatz, der sich in hohen 5_{α} -reduzierten Testosteronmetaboliten äussert. Während der Reifungsperiode treten diese drei Steroidgruppen in einen Zustand der Ausgewogenheit, der durch geringere ANDROST-4-EN-DION-Werte, ansteigende TESTOSTERON-Werte und abnehmende 5α -reduzierte Steroid-Anteile gekennzeichnet ist. Bei den Tieren mit abgeschlossener Reife (49 Tage alte Tiere und später) wandelt sich das Spektrum zu niedereren ANDROST-4-EN-DION-Werten , hohen TESTOSTERON-Anteilen und niederen 5α-reduzierten Anteilen um.
Bei kryptorchen Tieren finden sich im Vergleich zu den Kontrolltieren nur geringfügig differierenden TESTOSTERON-Werten höhere ANDROST-4-EN-DION-Werte, also Veränderungen im Sinne junger Tiere, wogegen die niederen 5α-reduzierten Anteile im katabolen Testosteronmetabolismus eher zu dem Bild der alten Tiere neigen.

Im Bereich des Δ5-Weges der Testosteronsynthese sind die höheren kryptorchen Werte zusammen mit den für PROGESTERON und 17-OH-PROGESTERON tendenziell erhöhten Normalwerten ein Indiz für die kryptorchismusbedingte Verminderung der 3β-OH-Steroid-Dehydrogenase-Aktivität.
Aussagen, ob PREGNENOLON über den Δ5-Synthese-Weg oder den Δ4-Synthese-Weg des Testosteronmetabolismus zu TESTOSTERON umgewandelt wird, lassen sich aus der vorliegenden Studie nicht ableiten. Die Veränderungen nach viertägigem artifiziell erzeugtem Kryptorchismus sind quantitativ stets gering.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die In-vitro-Biokonversion von ^{3}H-PREGNENOLON im Verlauf des Testosteronmetabolismus wurde an Inkubationen von Hodenmaterial normaler und artifiziell 4 Tage kryptorcher Ratten während der Reifeperiode untersucht.

Präpubertäre und 3 Monate alte Tiere metabolisierten das Substrat PREGNENOLON sehr gut, kryptorche Tiere dabei grundsätzlich besser als Kontrolltiere .

17-OH-PREGNENOLON als erste Zwischensubstanz im Δ5-Syntheseweg war nach der zweistündigen Inkubation bei allen Altersgruppen in erheblichen Mengen nachweisbar, wogegen DHA und ANDROST-5-EN-DIOL nur in geringsten Mengen vertreten waren. Sowohl für 17-OH-PREGNENOLON als auch für ANDROST-5-EN-DIOL fanden sich höhere Werte bei kryptorchen Tieren, die mit entsprechend niedereren Werten im Δ4-Syntheseweg korrelierten und Ausdruck einer bei Kryptorchismus verminderten Aktivität der 3β-OH-Steroid-Dehydrogenase sind.

ANDROST-4-EN-DION nimmt im Verlauf der sexuellen Reifung der Tiere von präpubertären Werten um 30 % (Anteil am Steroidspektrum) auf 10 % ab, dabei finden sich bei kryptorchen Tieren höhere Werte - eine Tendenz kryptorcher Tiere zum Status junger Normaltiere.

TESTOSTERON nimmt anteilmäßig mit steigendem Lebensalter der Tiere zu, wobei Differenzen zwischen normalen und kryptorchen Tieren relativ gering bleiben.

ANDROSTANDIOL und ANDROSTERON nehmen im Verlauf der Geschlechtsreife mengenmäßig ab, DHT und ANDROSTANDION werden nur in geringen Mengen registriert. Insgesamt gesehen liegt die Summe aller 5α-reduzierten Steroide, die vor allem vor und während der Pubertät rasch abnimmt, bei den kryptorchen Tieren unter den Normalwerten - eine Tendenz zum Status älterer Normaltiere.

Einzig DHT in der Rolle der primär aktiven Form des TESTOSTERONS ist bei den kryptorchen Tieren unter den 5α-reduzierten Steroiden erhöht.

Vier Tage artifiziell kryptorche Rattenhoden sind gegenüber den Hoden von normalen Tieren im Gewicht reduziert.

* * *

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Jürgen R. Bierich, Direktor der Kinderklinik der Universität Tübingen, danke ich für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Hause.

Herrn Prof. Dr. Derek Gupta, Leiter der endokrinologischen Abteilung der Kinderklinik, verdanke ich das Thema dieser Arbeit.
Dafür sowie für die großzügige hilfreiche Unterstützung bedanke ich mich herzlich.

Herrn OA Dr. med. Klaus Rager danke ich für seine freundliche wissenschaftliche und technische Beratung und die humorvolle Protektion.

Herrn Dr. med. Brügmann danke ich für zwei Computer-Rechen-Programme.
Den Studienkolleginnen E. Arnold und A. Hauschild sowie den Assistentinnen des Hormonlabors danke ich für labortechnische Hinweise.
Traudel Wiesenauer/Winterbach besorgte freundlicherweise die Fotoreproduktion der Zeichnungen.

Meinem Studienkollegen und Freund cand.med. Stefan Grumbach danke ich für die fruchtbaren technischen und wissenschaftlichen Diskussionen und die Assistenz bei den operativen Eingriffen an den Versuchstieren.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ARNOLD, EVA: In-Vitro-Biokonversion von Progesteron bei normalen und vier Tage künstlich kryptorchen Ratten während der Reifeperiode.
Med. Diss., Tübingen, 1976

2. BAULIEU, E.E., and P. MAUVAIS-JARVIS: Studies on testosterone metabolism. I.Conversion of testosterone-17α-^{3}H to 5α- and 5β-androstane-3α,17β-diol-17α-^{3}H : A new 17β-hydroxyl pathway. J.Biol..Chem. 239, 1964, 1569

3. BENDRAK, E., V. SAMOILOFF and U.A. SOD-MORIAH: Metabolism of 3β-hydroxy-5-ene-steroids by testes of rats acclimatized to an hot environment.
J.Endocr. 58, 1973, 199 - 205.

4. BULLE,G , A.ATTANASIO und K. RAGER: Klinische Befunde zur Behandung des Hodenhochstandes.
Mschr. Kinderheilkunde 123,1975, 354 - 355.

5. CHRISTENSEN, A.K. and N.R. MASON: Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-^{14}C in vitro.
Endocrinology 76, 1965, 646 - 656.

6. CLEGG, E.J. : Some effects of artificial cryptorchidism on the accessory reproductive organs of the rat.
J. Endocr. 20, 1960, 210 - 219.

7. CLEGG, E.J. : Further studies on artificial cryptorchidism : Quantitative changes in the interstitial cells of the rat testis.
J. Endocr. 21, 1961, 433 - 441.

8. CLEGG, E.J. : Studies on artificial cryptorchidism : Degenerative and regenerative changes in the germinal epithelium of the rat testis.
J. Endocrinology 27, 1963, 241 - 251.

9. DAVIS, J.R. and C.F. FIRLIT: The germinal epithelium of cryptorchid testes experimentally induced in prepubertal and adult rats. Fertility & Sterility 17, 1966, 187 - 200.

10. EICHNER, M., K. RAGER and D. GUPTA: Concentration of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in pituitary and serum of male rats and the influence of luteinizing hormone releasing hormone in relation to sexual maturation. J. Endocr. 65, 1975, 7P - 8P.

11. EICHNER, M., K. RAGER, A. ATTANASIO, D. GUPTA: Effect of bilateral cryptorchidism upon pituitary and serum levels of LH and FSH in sexually maturing male rats. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 193, 1975, 87

12. EIK-NES, K. and M. KEKRE: Metabolism in vivo of steroids by canine testes. Biochim. Biophys. Acta 78, 1963, 449 - 456.

13. FICHER, M. and E. STEINBERGER : Conversion of progesterone to androsterone by testicular tissue at different stages of maturation. Steroids 12, 1968, 491 - 506.

14. FOLMAN, Y., J.G. SOWELL and K.B. EIK-NES: The presence and formation of 5α-dihydrotestosterone in rat testis in vivo and in vitro. Endocrinology 91, 1972, 702 - 710.

15. GLOYNA, R.E. and J.D. WILSON: A comparative study of the conversion of testosterone to 17-OH-5α-androstan-3-one (DHT) by prostate and epididymis. Journal of Clinical Endocr. 29, 1969, 970 - 977.

16. GRUMBACH, STEFAN: Vergleich der In-vitro- Biokonversion von Pregnenolon zwischen Ratten und menschlichem Hodengewebe während der sexuellen Reifung. Med. Diss., Tübingen, 1977. (In Vorbereitung)

17. GUPTA, D.: Inhärente Tendenz zur Weiblichkeit. Sexualmedizin 3, 1974, 68 - 74.

18. GUPTA, DEREK : Gonadal steroids and gonadotropin feedback regulation of mammalian sexual maturation.
In : Recent Progress in Reproduktive Endocrinology.
Eds. P.G. Crossignani & V.H.T. James, London ,
Academic Press, 1974.

19. GUPTA, D., A. ATTANASIO and S. RAAF: Plasma estrogen and androgen concentrations in children during adolescence.
J. of Clinical Endocr. and Metabol. 40, 1975, 636 - 643.

20. GUPTA, D., E. McGAFFERTY and K. RAGER: Plasma 5α-dihydrotestosterone in adolescent males at different stages of sexual maturation.
Steroids 19, 1972, 411 - 431.

21. GUPTA, D., K. RAGER, G. PFISTER and W. VOGT: Bioconversion of the androgen precursors by pre- and postpubertal rat testes with special reference to local irradiation and gonadotropin stimulation.
Steroids 21, 1973, 17 - 20.

22. GUPTA, D., K. RAGER, K. ZECH and W. VOELTER : Hypothalamic-pituitary-testicular feedback mechanism during mammalian sexual maturation.
IN : Hypothalamic Hormones - Structure , Synthesis and Biological Activity.
Eds.: D. Gupta, W.Voelter, Weinheim , Verlag Chemie, 1975.

23. GUPTA, D., K. RAGER, A. ATTANASIO, W. KLEMM, M. EICHNER :
Sex steroid hormones during multiphase pubertal developments.
Steroid. Biochem. 6, 1975, 859 - 868.

24. GUPTA, D., K. RAGER, J. ZARZYCKI and M.EICHNER : Levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism.
J. Endocr. 66 , 1975, 183- 193.

25. GUPTA, D., K. RAGER, and M. EICHNER: Age-dependent changes in the synthesis and release of pituitary gonadotropins in the male rat following LH-RH and cryptorchidism. Ped.Res. 9, 1975, 670.

26. GUPTA,D., K. RAGER, M. EICHNER, K. ZECH, S.FUCHS and W. VOELTER: Pituitary gonadotropins and androgen release induced by a synthetic tetrapeptide in male prepubertal and adult rats. J. Endocr. 64, 1975, 391 - 192.

27. GUPTA, D., J. ZARZYCKI and K. RAGER: Plasma testosterone and dihydrotestosterone in male rats during sexual maturation and following orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism. Steroids 25, 1975, 33 - 42.

28. HAGEN, A. and K.B. EIK-NES: Testosterone biosynthesis in the canine in vivo following infusion of 17α-hydroxy-4-^{14}C-progesterone and 7α-^{3}H-dehydroepiandrosterone via the spermatic artery. Biochim. Biophys. Acta 90, 1964, 593 - 599.

29. HAGEN, A. and K.B. EIK-NES: Conversion of 17α-hydroxypregnenolon to 17α-hydroxyprogesteron by the canine testis in vivo. Biochim. Biophys. Acta 86, 1964, 372 - 379.

30. HALL, P. F., D.C. IRBY and D.M. DE KRETSER: Conversion of cholesterol to androgens by rat testes: Comparison of interstitial cells and seminiferous tubules. Endocrinology 84, 1969, 488 - 496.

31. HALL, P. F., C.C. SOZER and K.B. EIK-NES: Formation of dehydroepiandrosterone during in vivo and in vitro biosynthesis of testosterone by testicular tissue. Endocrinology 74, 1964, 35 -43.

32. HANSIS, DOROTHEA: Biotransformation von Androgenvorstufen in prä- und postpubertären Rattenhoden unter dem Einfluss von lokaler Bestrahlung, Gonadotropinbehandlung und einer Antiandrogenbehandlung. Med. Diss., Tübingen, 1975.

33. INANO, H., Y. HORI and B. TAMAOKI: Effect of age on testicular enzymes related to steroid bioconversion.
Colloquia on Endocrinology 16, 1967, 105 - 119.

34. INANO, H., H. NAKANO , M. SHIKITA and B. TAMAOKI: The influence of various factors upon testicular enzymes related to steroidogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 137, 1967, 540 - 548.

35. INANO, H. and B. TAMAOKI: Effect of experimental bilateral cryptorchidism on testicular enzymes related to androgen formation.
Endocrinology 83, 1968, 1074- 1082.

36. JENDRICKE, K., K. RAGER und E. SCHÄFER: Vorläufige Ergebnisse klinischer, biochemischer und anatomischer Untersuchungen bei Maldescensus testis.
Mschr. Kinderheilk. 121, 1973, 634 - 635.

37. KAHNT, F.W., R. NEHER, K.SCHMID und A. WETTSTEIN: Bildung von 17α -Hydroxy-5-Pregnenolon und 3ß-Hydroxy-17-keto-5-Androsten (DHA) in Nebennieren und Testisgewebe.
Experimentia 17, 1961, 19 - 20.

38. KORMANO, K., M. HÄRKONEN, E. KONTINEN: Effect of experimental cryptorchidism on the histochemically demonstrable dehydrogenases of the rat testis.
Endocrinology 74, 1964, 44- 51.

39. LYNN, W.S. and R.H. BROWN: The conversion of progesterone to androgens by testes.
J. Biol. Chem. 232, 1985, 1015 - 1030.

40. MORRIS, M.D. and I.L. CHAIKOW: The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland and testis of the rat: Dietary versus endogenous contributions.
J. Biol. Chem. 234, 1959, 1095 - 1097.

41. MUROTA, S., M. SHIKITA and B. TAMAOKI: Intracellular distribution of the enzymes related to androgen formation in mouse testes.
Steroids 5, 1965, 409 - 413.

42. NEHER, R. und A. WETTSTEIN: Occurrence of 5-3β-hydroxysteroids in adrenal and testicular tissue.
Acta. Endocr. 35, 1960, 1 - 7.

43. OH, R. and B. TAMAOKI: In vitro biosynthesis of androgens in canine testes.
Acta Endocr. 74, 1973, 615 - 624.

44. RABOCH, J.: Verpasste Chance für Kryptorchiker.
Sexualmedizin 9, 1973, 420 - 421.

45. RAGER, K., E. ARNOLD, H. JAUCH and D. GUPTA: Effect of age on steroidogenesis in experimental cryptorchid rats.
J. Endocr. 63, 1974, 16 - 17.

46. RAGER, K., M. EICHNER, W. WILLMANN and D. GUPTA: Studies on the relative sensitivity for androgen feedback inhibition in rats during sexual maturation.
Ped. Res. 9, 1975, 687.

47. RAGER, K., J. ZARZYCKI , M. EICHNER and D. GUPTA: Effects of experimental bilateral cryptorchidism and castration on the plasma gonadotropins in male rats during sexual maturation.
Res.Exp.Med. 165, 1975, 55 - 59.

48. RIVAROLA, M.A., E.J. PODESTA and H.E. CHEMES: In vitro testosterone -^{14}C metabolism by rat seminiferous tubules at different stages of development : Formation of 5α-androstandiol at meiosis.
Endocrinology 91, 1972, 537 - 542.

49. RUOKONEN, A. and R. VIKHO: Steroid metabolism in human and boar testis tissue. Steroid concentrations and the position of the sulfate group in steroid sulfates.
Steroids 23, 1974, 1 - 16.

50. SHIKITA, M., H. INANO and B. TAMAOKI: Further studies on 20α-hydroxy-steroid dehydrogenase of rat testes.
Biochemistry (W) 6, 1967, 1760 - 1764.

51. SHIKITA, M. , H. KAKIZAKI and B. TAMAOKI: The pathway of formation of testosterone from 3β-hydroxy-pregn-5-en-20-one by rat testicular microsomes.
Steroids 4, 1964, 521 - 531.

52. SHIKITA, M. and B. TAMAOKI: Testosterone formation by subcellular particles of rat testes.
Endocrinology 76, 1965, 563 - 569.

53. SLAUNWHITE, W.R. and Jr. and M.J. BURGETT: In vitro testosterone synthesis by rat testicular tissue.
Steroids 6, 1965, 721 - 734.

54. SLAUNWHITE, W.R. and L.T. SAMUELS: Progesterone as a precursor of testicular androgens.
J.Biol. Chem. 220, 1956, 341.

55. STEINBERGER, E. and M. FICHER: Conversion of progesterone to testosterone by testicular tissue at different stages of maturation.
Steroids 11, 1968, 351.

56. STEINBERGER, E. and M. FICHER: Formation and metabolism of testosterone in testicular tissue of immature rats.
Endocrinology 89, 1971, 697 - 684.

57. TAMAOKI, B. and M. SHIKITA: A dynamic study on the pathway of testosterone formation from progesterone and pregnenolone by rat testicular microsomes.
Europ. Journ. of Steroids 1, 1966, 351 - 359.

58. TAREN, D., K. MENON, E. FORCHIELLI and R.I.DORFMAN: In vitro enzymatic cleavage of the cholesterol side chain in rat testis preparations.
Steroids 3, 1964, 381 - 390.

59. YAMADA, M.,S.YASUE and K. MATSUMOTO: Formation of 5α-reduced products from testosterone in vitro by germ cells from immature rats.
Acta Endocr. 71, 1972, 393 - 408.

60. YANAIHARA, T. and H. TROEN: Studies on human testis. I. Biosynthetic pathways for androgenformation in human testicular tissue in vitro.
Journ. of Clinical Endocr. and Metabol. 34, 1972, 763-792.

LEBENSLAUF

Am 12. August 1951 wurde ich, Karl Bernhard Nübel, als Sohn des Dr. med. Karl Nübel, Facharzt für Chirurgie und seiner Ehefrau, der Dr. med. Gisela Nübel geb. Goessler, Ärztin, in Reutlingen geboren.
Ich habe noch 3 Geschwister.
Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Jos-Weiß-Volksschule in Reutlingen. In den Jahren 1962 bis 1970 war ich Schüler am Friedrich-List-Gymnasium in Reutlingen; dort legte ich am 19.6.70 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1970/71 immatrikulierte ich mich an der rechtswissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen. Das Studium der Medizin nahm ich am 7.April 1971 an der Universität Hohenheim auf; dort legte ich am 16.3.1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. Danach kehrte ich an die Eberhard-Karls-Universität nach Tübingen zurück. Am 21.9.1973 bestand ich dort die ärztliche Vorprüfung. Mit dem medizinischen Staatsexamen schloß ich am 21.12.1976 das Studium der Medizin in Tübingen ab.

Druck: Reprografik E. Müllerbader
7025 Plattenhardt, Forststr. 18
Telefon (0711) 77 15 67